

Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen
der Stresstoleranz von *Aspergillus fumigatus* bei
der Interaktion mit Immuneffektorzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franziska Leßing

geboren am 20. Dezember 1978 in Bad Hersfeld

2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel A. Brakhage, Universität Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Kothe, Universität Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer, Universität Magdeburg

Datum der öffentlichen Verteidigung: 08.09.08

Abstract:

In immunocompromised patients, the lung is the site of infection of *Aspergillus fumigatus*. The most prominent immune effector cells in the lung are alveolar macrophages and neutrophilic granulocytes, which were thought to kill *A. fumigatus* by the production of reactive oxygen intermediates (ROI). Since contact with *A. fumigatus* hyphae induces the “oxidative burst” in the neutrophilic granulocytes, which is coupled with the secretion of ROI, reactive nitrogen intermediates (RNI) and degranulation, an important role of this reaction for killing *A. fumigatus* was highly suggested. Therefore, we investigated the enzymatic ROI detoxifying system by proteome analysis of *A. fumigatus* challenged by H₂O₂. ROI are produced by the NADPH oxidase of the neutrophilic granulocytes, which is induced upon pathogen recognition. Patients with a defect in the NADPH oxidase show increased susceptibility to *A. fumigatus* infections.

Therefore, the role of ROI in killing *A. fumigatus* during infection, the mechanisms of ROI detoxification should be tightly regulated in this fungus. Most genes responsible for ROI detoxification are regulated by the transcription factors Yap1p and Skn7p in *Saccharomyces cerevisiae*. In this work, we identified the Yap1p and Skn7p homologous proteins AfYap1 and AfSkn7 in *A. fumigatus* and demonstrated their analogous function in the regulation of ROI detoxification. Nuclear localization of a functional AfYap1-eGFP fusion was detected after treatment with H₂O₂, menadione or diamide, demonstrating the similar mechanism of activation of this transcription factor in *A. fumigatus*. By proteome analysis, the regulatory function of AfYap1 under oxidative stress was shown. Deletion of either *Afyap1* or *Afskn7* in *A. fumigatus* led to increased sensitivity of the strains to H₂O₂ and tBOOH. The deletion of *Afyap1* or *Afskn7* and the double deletion of the two transcription factors did not result in attenuated virulence in a neutropenic mouse infection model.

Co-incubation of *A. fumigatus* conidia with macrophages showed, that the production of ROI by these immune effector cells is essential for the defence against the fungus, since the addition of glutathione decreased killing of conidia. Interestingly, the co-incubation of conidia of the *Afyap1* and *Afskn7* deletion mutants with macrophages did not show an altered killing rate compared to the wild type. Therefore we hypothesize an important role for ROI in activation of killing mechanisms against *A. fumigatus* conidia by macrophages. Coincubation of *A. fumigatus* hyphae with neutrophilic granulocytes did not show an influence of the presence of ROI on the killing rate of *A. fumigatus*. Moreover, no altered killing rate of the *Afyap1* or *Afskn7* deletion mutant compared with the wild type was observed. These data challenge the hypothesis that ROI such as superoxide anions and peroxides play a direct role

in killing of *A. fumigatus*. This conclusion was further supported by the finding that killing of *A. fumigatus* wild-type and $\Delta Afyap1$ mutant germlings by human neutrophilic granulocytes worked equally well irrespective whether glutathione or an NADP-oxidase inhibitor was added to the cells.

To elucidate the killing mechanism of *A. fumigatus* by granulocytes and the corresponding defence mechanism of the fungus, we compared the response of *A. fumigatus* to neutrophilic granulocytes after different times of co-incubation by proteome analysis. According to this analysis there are several potential targets in *A. fumigatus* that might be attacked by the neutrophilic granulocytes which need to be analysed further.

Since the importance of ROI for killing of *A. fumigatus* by neutrophils is questionable, the role of RNI on the killing of *A. fumigatus* by macrophages and neutrophilic granulocytes was studied. NO is produced by the NO synthase of immune effector cells. After pathogen recognition, NO synthase production is stimulated by similar cytokines that are required for ROI induction. It is therefore very likely that both radicals are present in infected tissue and that they interact to form highly reactive intermediates like e.g. peroxynitrite. The addition of the NO synthase inhibitor L-NAME to the confrontation assay of macrophages and *A. fumigatus* showed that NO radicals are not essential for the killing of conidia by macrophages. In co-incubation experiments of neutrophilic granulocytes with *A. fumigatus* hyphae, however, a slight effect of L-NAME on the killing was suggested. Proteome analysis of the response of *A. fumigatus* to NO stress induced by DETA NO showed induction of the general stress and ROI response. NO specific response indicated by the induction of the homologs of the flavohemoglobin denitrosylase and the nitrosogluthathione reductase of *Cryptococcus neoformans* was only slightly induced under these conditions. Therefore, the role of NO radicals in the defence against *A. fumigatus* and the mechanisms by which *A. fumigatus* detoxifies these compounds still remain unclear and await further investigation.

Kurzzusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein opportunistisch pathogener Pilz, der die Lunge von immunokomprimierten Patienten infizieren kann. Die Immuneffektorzellen der Lunge werden in erster Linie durch Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten repräsentiert, die bei Pathogenerkennung reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) sekretieren. Lange Zeit wurde angenommen, dass die hohen Konzentrationen an ROI auch bei *A. fumigatus*-Infektionen der Pathogenabwehr dienen. Patienten mit einem Defekt der NADPH-Oxidase, die für die ROI Produktion der Immuneffektorzellen essentiell ist, zeigten gegenüber vielen Pathogenen, u.a. gegen *A. fumigatus*, erhöhte Suszeptibilität.

Die Fähigkeit des Pathogens ROI effektiv zu detoxifizieren ist demnach eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Infektion. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind viele Gene, deren Produkte an der ROI Detoxifizierung beteiligt sind, durch die Transkriptionsfaktoren Yap1p und Skn7p reguliert. Die entsprechenden Homologe Afyap1 und Afskn7 wurden in dieser Arbeit in *A. fumigatus* identifiziert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass AfYap1 in *A. fumigatus* unter oxidativem Stress durch einen ähnlich geregelten Prozess wie in *S. cerevisiae* im Kern akkumuliert. Des Weiteren konnten mittels Proteomanalysen viele AfYap1 Zielgene identifiziert werden, die bereits in *S. cerevisiae* beschrieben wurden. Promotorsequenz- und „Northern blot“-Analysen zeigten jedoch, dass anders als in *S. cerevisiae* die Glutathion-abhängigen Mechanismen zur ROI Detoxifizierung hauptsächlich durch AfSkn7 reguliert sind, wohingegen AfYap1 die Thioredoxin-abhängigen Mechanismen kontrolliert. Die Deletion der Gene beider Transkriptionsfaktoren erhöhte die Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber H₂O₂ und tBOOH. Die Deletion von *Afyap1* führte ebenfalls zur erhöhten Sensitivität gegenüber Menadion, die Deletion von *Afskn7* dagegen zur Menadionresistenz.

Trotz unterschiedlicher Sensitivität gegenüber ROI zeigten die Deletionsstämme in Koinkubationsversuchen mit Immuneffektorzellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen eine vergleichbare Abtötungsrate. Interessanterweise reduzierte jedoch die Zugabe von Glutathion oder die Abtötung von *A. fumigatus* durch Makrophagen. Die Abtötungsrate von *A. fumigatus* Hyphen durch neutrophile Granulozyten wurde durch die Zugabe nicht verändert. Es ist daher davon auszugehen, dass ROI an sekundären Mechanismen der Abwehr von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen beteiligt sind, bei der Abtötung von *A. fumigatus* Hyphen durch neutrophile Granulozyten jedoch keine Rolle spielen. Neutropenische Mäuse wurden durch die Deletionsstämme in gleichem Maße wie

durch den Wildtyp getötet. Erste Infektionsversuche mit Cortisonacetat behandelten Mäusen lassen einen Effekt der Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* bei der Virulenz in diesem Mausmodell vermuten. Proteomanalysen der Stressantwort von *A. fumigatus* nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten zeigten neben der Stressinduktion der generellen ROI Antwort die Induktion einiger Proteine, die vermuten lassen, dass der Pilz mehrere verschiedene Schutzmechanismen aktiviert.

Deshalb wurde die Antwort von *A. fumigatus* auf reaktive Stickstoffintermediate (RNI) untersucht. RNI werden von Immuneffektorzellen bei Pathogenerkennung durch die NO Synthase gebildet. Die Stimulation der NO Synthase erfolgt durch dieselben Zytokine, die auch zur Induktion der NADPH-Oxidase führen. Die Zugabe des NO Inhibitors L-NAME hatte bei der Koinkubation von Makrophagen mit *A. fumigatus* Konidien keinen Effekt auf die Absterberate der Pilze. Hingegen ist ein Effekt sichtbar bei Koinkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit neutrophilen Granulozyten. In Proteomanalysen von *A. fumigatus* nach Stressinduktion mit dem NO Donor DETA NO wurde neben der Induktion der generellen und der ROI Stressantwort auch eine leichte Induktion der NO-spezifischen Stressantwort festgestellt. *A. fumigatus* verfügt demnach über Mechanismen sich effektiv vor NO Radikalen zu schützen. Die Rolle dieser Mechanismen, bei Infektionen mit *A. fumigatus* muss in nachfolgenden Versuchen geklärt werden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Kurzzusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	IX

Einleitung

1. Der humanpathogene Pilz <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.1 Infektionsverlauf und Abwehrmechanismen des Körpers gegen <i>A. fumigatus</i>	2
2. Reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) und ihre Rolle im Infektionsverlauf	3
2.1 ROI in der Infektion: Makrophagen und Granulozyten.	3
2.2 ROI Detoxifizierungsmechanismen	4
2.3 Regulation der ROI Antwort	6
2.3.1 Der Transkriptionsfaktor Yap1p	6
2.3.1 Der Transkriptionsfaktor Skn7p	7
3. Stickstoffradikale in Infektionen	8
3.1 Bildung von NO Radikalen	8
3.2 NO Detoxifizierung	9
4. Proteomics	10
4.1 Prinzip der Auftrennung von Proteinen in zwei Dimensionen	10
5. Ziele der Arbeit	11

Material und Methoden

1. Stämme und Medien	12
1.1 Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	12
1.2 Verwendete <i>A. fumigatus</i> Stämme	12
1.3 Verwendete Plasmide	12
1.4 Medien und Kulturbedingungen	13
2. Molekularbiologische Methoden	13
2.1 Isolation von Nukleinsäuren	13
2.1.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	13
2.1.2 Isolation chromosomaler DNA aus <i>A. fumigatus</i>	13
2.1.3 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>A. fumigatus</i>	14
2.1.4 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	14
2.2 Verwendung von Nukleinsäuren	14
2.2.1 Restriktionsverdau von DNA	14
2.2.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR	14
2.2.3 Sondenmarkierung ECL	16
2.2.4 Sondenmarkierung DIC	16
2.2.5 Southern Blot	16
2.2.6 Northern Blot	16
2.2.7 Transformation von <i>E. coli</i>	17

2.2.8 Transformation von <i>A. fumigatus</i>	17
3. Biochemische Methoden	17
3.1 Enzymaktivitätsbestimmung	17
3.1.1 Präparation von nativen Proteinextrakten	17
3.1.2 Bestimmung der Thioredoxinreduktaseaktivität	17
3.1.3 Bestimmung der Katalaseaktivität photometrisch und im Gel.....	18
3.2 2D Gel Elektrophorese	18
3.2.1 Isolation von Proteinextrakten aus Myzel	18
3.2.2 Proteinextrakte aus <i>A. fumigatus</i> Hyphen nach Koinkubation mit PMNs.....	18
3.2.3 Isolation von Proteinextrakten aus Kulturüberstand	19
3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	19
3.2.5 Isoelektrische Fokosierung (IEF)	19
3.2.6 Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension	19
3.2.7 Detektion von DIGE Farbstoffen	20
3.2.8 Nachfärbung von 2D Gelen.....	20
3.2.8.1 Colloidal Coomassie	20
3.2.8.2 Ruthenium	20
3.2.8.3 Silber	20
3.2.9 Auswertung von 2D Gelen	20
3.3 Sensitivitätstest gegen ROI	20
3.3.1 Hemmhofplattenassay	20
3.3.2 Tropfplattentest	21
4. Zellbiologische Methoden.....	21
4.1 Isolation von PMNs.....	21
4.2 Koinkubation von PMNs mit <i>A. fumigatus</i>	21
5. Cytologische Methoden.....	21
5.1 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie.....	21
6. Mausinfektionsmodell	21

Ergebnisse

1. Optimierung der 2D-Gelelektrophorese	22
1.1 Proteinisolation aus <i>A. fumigatus</i>	22
1.2 Proteinsolubilisierung in unterschiedlichen Lysepuffern.....	23
2. AfYap1 vermittelte Stressantwort von <i>A. fumigatus</i> auf ROI	24
2.1 Oxidativer Stress in <i>A. fumigatus</i>	24
2.1.1 Induktion der Thioredoxinreduktase durch 2mM H ₂ O ₂	24
2.1.2 Proteomanalyse der oxidativen Stressantwort	25
2.2 Charakterisierung des Yap1p Homologen AfYap1 von <i>A. fumigatus</i>	29
2.2.1 Sequenzvergleich und Homologiesuche von Yap1p.....	29
2.2.2 Kernlokalisationsstudien von AfYap1	30
2.2.3 Deletion von <i>Afyap1</i>	32
2.2.4 Komplementation der <i>Afyap1</i> Deletion.....	34

2.2.5 Sensitivität des $\Delta Afyap1$ Stammes gegen ROI.....	35
2.2.6 Regulation der Katalaseaktivität durch AfYap1	36
2.2.7 Vergleichende 2D-Gele der Stressantwort des Wildtyps und $\Delta Afyap1$ auf H_2O_2	38
2.2.8 Ein neues AfYap1 Zielgen: <i>pnr1</i>	41
2.2.9 Diamidinduziertes Sekretom von <i>A. fumigatus</i> wt und $\Delta Afyap1$	42
2.2.10 Einfluss von ROI und AfYap1 auf das „killing“ von <i>A. fumigatus</i> durch PMNs	45
2.2.11 Mauseinfektionen mit $\Delta Afyap1$ Konidien.....	47
3. Charakterisierung von <i>Afskn7</i> und seiner Rolle bei der Abwehr von ROI.....	47
3.1 Deletion von <i>Afskn7</i>	48
3.2 Sensitivität von $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ gegen ROI.....	49
3.3 Promotoranalysen ROI detoxifizierender Gene in <i>A. fumigatus</i>	51
3.4 „Northern blot“-Analyse ROI detoxifizierender Gene.....	53
3.5 Sensitivitätstest gegen „Congo Red“, Amphotericin B und Imidazol	54
3.6 Makrophagen „killassay“	56
3.7 Nachweis von ROI aus neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von Cytochrom C Reduktion	57
3.8 Mauseinfektionen im Cortisonacetatmodell	58
4. Bedeutung von NO Radikalen in <i>A. fumigatus</i> Infektionen	60
4.1 Detoxifizierung von NO Radikalen in <i>A. fumigatus</i>	60
4.2 „Northern blot“-Analysen nach NO Stressinduktion	61
4.3 Proteomanalyse von <i>A. fumigatus</i> nach Zugabe von 2,5mM DETA NO	62
4.4 Bedeutung von NO Radikalen beim Abtöten von <i>A. fumigatus</i> durch Makrophagen und Granulozyten.....	65
5. Analyse der Stressantwort von <i>A. fumigatus</i> nach Konfrontation mit PMNs.....	67
5.1 AfYap1 Lokalisationsstudien nach Koinkubation mit PMNs.....	67
5.2 2D-Gelanalyse von <i>A. fumigatus</i> nach Konfrontation mit PMNs.....	68
Diskussion	
1. Oxidativer Stress in <i>A. fumigatus</i>.....	76
1.1 Reaktionen von <i>A. fumigatus</i> auf ROI	76
1.2 Regulation der oxidativen Stressantwort durch AfYap1.....	77
1.3 Der Einfluss von oxidativem Stress auf die Sekretion von Proteinen.....	79
1.4 Der Einfluss von AfSkn7 bei der Regulation der oxidativen Stressantwort von <i>A. fumigatus</i> in Kooperation mit AfYap1.....	80
1.5 Einfluss von AfSkn7 und AfYap1 auf den Schutz von <i>A. fumigatus</i> gegen Fungizide	83
1.6 Mauseinfektionen mit <i>A. fumigatus</i> Wildtyp, $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$	85
1.7 Die Rolle von ROI und RNI bei der Abwehr von <i>A. fumigatus</i> Konidien durch Makrophagen.....	86

1.8 Die Rolle des „oxidative burst“ bei der Abwehr von <i>A. fumigatus</i> Hyphen durch neutrophile Granulocyten	86
1.9 Proteomanalyse der Stressantwort von <i>A. fumigatus</i> nach Koinkubation mit neutrophilen Granulocyten.....	88
2. Nitrosativer Stress in <i>A. fumigatus</i>	91
2.1 Analyse der nitrosativen Stressantwort von <i>A. fumigatus</i>	91
2.2 Die Rolle von NO Radikalen bei der Abwehr von <i>A. fumigatus</i> durch Immuneffektorzellen.....	93
Literaturstellen	95

Abkürzungen

A	Adenin	l	Liter
ADP	Adenosindiphosphat	LB	Luria Broth
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimalmedium	mg	Miligramm
Amp	Ampicillin	µg	Mykrogramm
ATP	Adenosintriphosphat	min	Minute
BSA	Rinderserumalbumin	Mw	molekulare Masse
bp	Basenpaar	NO	Stickstoffradikal
C	Cytosin	NOS	NO Synthase
°C	Grad Celsius	NOX	NADPH- Oxidase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	O ₂ ⁻	Superoxidation
cDNA	Zur RNA komplementäre	O ₂ ²⁻	Peroxidation
DNA		OH [•]	Hydroxylradikal
CDG	chronische Granulomatose	ORF	offener Leserahmen
Δ	Deletion	PAGE	Polyacrylamidgel- elektrophorese
Da	Dalton	PCR	Polymerasekettenreaktion
DETA NO	Diethylenetriamin- Stickstoffmonoxyd	PEG	Polyethylenglycol
DNA	Desoxiribonukleinsäure	Phleo	Phleomycin
dNTP	Desoxiribonukleotid	pl	isoelectrischer Punkt
DTT	Dithiotreithol	PMNs	polymorphkernige Neutrophile
EDTA	Ethylenediamin-tetra- Essigsäure	PtrA	Pyridithiamin
<i>et al.</i>	und andere	R	Resistenz
FKS	fötales Kälberserum	RNA	Ribonukleinsäure
G	Guanin	ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
g	Gramm	rpm	Umdrehungen pro Minute
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SD	Standardabweichung
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
HBSS	Hank`s gepufferte Salzlösung	T	Thymin
Hyg	Hygromycin	TE	Tris/EDTA Puffer
hypoth. P.	hypothetisches Protein	TNF α	Tumornekrosefaktor α
IA	invasive Aspergillose	2D	zwei dimensional
IAA	Iodacetamid	U	Unit Enzymaktivität
IEF	isoelectrische Fokussierung	v/v	Volumen/Volumen
IFN-γ	Interferon-gamma	wt	Wildtyp
IL-1β	Interleukin-1beta	w/v	Masse/Volumen
iNOS	induzierbare NO-synthase		
Kan	Kanamycin		
kbp	Kilobasenpaar		
kDa	Kilodalton		
kon. hypoth.	konserviertes, hypothetisches Protein		

Einleitung

1. Der human-pathogene Pilz *Aspergillus fumigatus*.

Der filamentöse Pilz *A. fumigatus* gehört zur Abteilung der Ascomycota und zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen. In der Natur ist der saprophytisch lebende Pilz am Abbau von totem Pflanzenmaterial beteiligt (Latge, 1999). Von der Konidiophore (Abbildung 1) werden 2-3µm große Sporen (Konidien) abgeschnürt, die sich durch die Luft verbreiten. Der Mensch inhaliert bis zu mehrere hundert Konidien pro Tag. Aufgrund ihrer geringen Größe erreichen sie die Alveolen der Lunge und werden dort vom Immunsystem erkannt und abgetötet (Latge, 1999). Bei Patienten mit defektem Immunsystem (wie z.B. bei AIDS- Patienten, Leukämiepatienten oder Immunsupprimierten nach Transplantationen) kann es zu Infektionen mit *A. fumigatus* in der Lunge kommen. Durch die vermehrte Anwendung von Immunsuppressiva aufgrund der steigenden Zahl von Transplantationen und Allergien stieg auch der Anteil *Aspergillus* infizierter Patienten in den letzten Jahren dramatisch an (Latge, 2001).

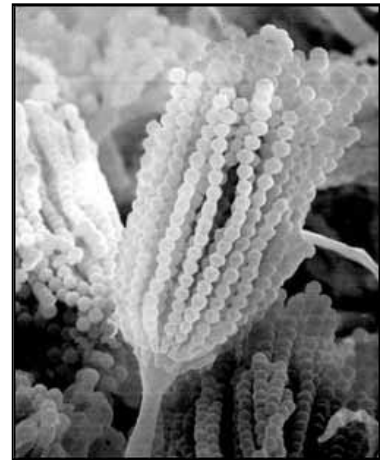


Abbildung 1: *Aspergillus fumigatus* Konidiophore. Laserscanning mikroskopische Aufnahme. Foto: Universität Karlsruhe

Die durch *A. fumigatus* verursachten Krankheitsbilder umfassen Allergien, Kolonisierung der Lunge ohne invasives Wachstum bis hin zur invasiven Aspergillose (IA) (Brakhage & Langfelder, 2002). Ein großes Problem bei der Behandlung von *A. fumigatus* Infektionen ist die kaum mögliche Früherkennung, die zusammen mit der schlechten Therapierbarkeit eine Mortalitätsrate von 50% bis 90% bedingt (Brakhage, 2005, Lin *et al.*, 2001). Deshalb ist die Untersuchung des Infektionsprozesses und der Virulenzgene von *A. fumigatus* essentiell für die Entwicklung neuer Medikamente (del Palacio *et al.*, 2003). Die Konidien von *A. fumigatus* sind uninukleär und der Kern ist haploid. Dadurch und durch die etablierten dominanten Selektionsmarker die Resistenz gegen Hygromycin, Phleomycin und Pyrithiamin verleihen, wird die genetische Manipulation des Pilzes erleichtert (Brakhage & Langfelder, 2002). Das Genom von *A. fumigatus* ist vollständig sequenziert (Nierman *et al.*, 2005). Zudem existieren $\Delta ku80$ Stämme, die durch einen Defekt der „non-homologous endjoining“ Ligase eine hohe homologe Rekombinationsfrequenz und damit eine große Transformationseffizienz aufweisen (da Silva Ferreira *et al.*, 2006,). Obwohl der sexuelle Zyklus von *A. fumigatus* bisher nicht beschrieben wurde und deshalb einfache genetische Manipulationen durch Kreuzung nicht möglich sind, wurden kürzlich die Kreuzungsspezifischen Paarungs- und Pheromongene im *A. fumigatus* Genom identifiziert (Paoletti *et al.*, 2005).

1.1 Infektionsverlauf und Abwehrmechanismen des Körpers gegen *A. fumigatus*.

Die erste Abwehrlinie des Körpers bei *A. fumigatus* Infektionen stellen die Alveolar-Makrophagen dar. In immunkompetenten Organismen phagozytieren sie die Konidien und töten sie im Phagolysosom (Philippe *et al.*, 2003) ab. Die Konidienoberfläche ist mit einer sogenannten „rodlet layer“ überzogen, die hydrophobe Eigenschaften vermittelt. Eine *rodA* Mutante ohne „rodlets“ war sensitiver gegen das Abtöten durch Makrophagen als der Wildtyp. Die Mutation hatte jedoch keinen Effekt auf die Pathogenität im Mausmodell (Paris *et al.*, 2003b, Thau *et al.*, 1994). Die Rezeptoren DC-SIGN, TLR2 und TLR4 sind für die Erkennung der *A. fumigatus* Konidien an der Makrophagenoberfläche verantwortlich und induzieren die Freisetzung von TNF- α und IL-1 α . Beide Zytokine sind für die Rekrutierung weiterer Phagozyten essentiell (Dubourdeau *et al.*, 2006a). TLR2^{-/-} Mäuse sind anfälliger für *A. fumigatus* Infektionen als Wildtypmäuse (Serrano-Gomez *et al.*, 2004, Balloy *et al.*, 2005). Bei Pathogenerkennung sekretieren Makrophagen ausserdem IL-8 und locken damit neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen an. Nicht nur TLR2 und TLR4 sondern auch sogenannte PRR „pattern recognition receptors“ sind an der Pathogenerkennung beteiligt. Sie führen z.B. zur TNF- α , NO^{*} und IL-6 Sekretion nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Li *et al.*, 2005).

A. fumigatus Konidien sind grau grün gefärbt, da sie 1,8-Dihydroxynaphthol-Melanin auf der Oberfläche tragen (Brakhage, 2005). Die Polyketidsynthase PksP ist für die Melaninsynthese essentiell. PksP Mutanten haben weiße Konidien, zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) und sind im Mausmodell fast avirulent (Brakhage & Liebmann, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass sich nach der Phagozytose von *pksP* Konidien durch Makrophagen mehr Wildtyp-Konidien in Phagolysosomen befanden als *pskP*-Konidien (Brakhage, 2005). Interessanterweise wird auf der Oberfläche der *pksP* Konidien mehr β -1,3-Glucan präsentiert, ein wichtiges Ziel der humanen Immunantwort. Das β -1,3-Glucan wird durch den Dectin-1 Rezeptor erkannt und führt zur Anheftung der Makrophagen und zur Phagozytose der Konidien (Luther *et al.*, 2007).

Nach der Phagozytose befinden sich Konidien in Phagosomen, die mit Enzymen enthaltenen Lysosomen zu Phagolysosomen fusionieren. Späte Phagolysosomen können einen pH von 5 aufweisen, was optimale Bedingungen für die dort wirkenden Lysozyme und Proteasen schafft. Die Behandlung mit einer leichten Base verhindert die Phagolysosomenfusion, wodurch bewiesen wurde, dass auch der pH hierbei eine große Rolle spielt (Lee *et al.*, 2003). Zu diesem Zeitpunkt wird die NADPH Oxidase zur Produktion von ROI aktiviert (Dubourdeau *et al.*, 2006b). Die NADPH Oxidase kann im Mausmodell durch Corticosteroide inhibiert werden (Philippe *et al.*, 2003). Ein Defekt der NADPH Oxidase führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *A. fumigatus* und anderen Pathogenen (Philippe *et al.*, 2003). Deshalb scheinen reaktive Sauerstoffspezies an der Abwehr von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen massgeblich beteiligt zu sein.

Die Konidien, die der Phagozytose durch Makrophagen entgehen, keimen aus und werden von neutrophilen Granulozyten attackiert. Granulozyten adhärieren an der Hyphen-oberfläche und induzieren den „oxidativen burst“ und Degranulation (Diamond & Clark, 1982, Diamond *et al.*, 1978, Meshulam *et al.*, 1995). Der „oxidative burst“ beschreibt die Freisetzung von Superoxidanionen, die zuvor durch die NADPH Oxidase gebildet wurden. Die Aktivierung der NADPH Oxidase ist vermutlich über einen Proteinkinase C (PKC) kontrollierten Signaltransduktionsweg reguliert (Inoguchi *et al.*, 2003). Die Myeloperoxidase setzt die gebildeten Radikale zu hypochloriger Säure um.

Es konnte gezeigt werden, dass primäre Granula kationische Proteine, Myeloperoxidase und Metalloproteasen enthalten, wohingegen sekundäre Granula Collagen, Lactoferrin und Histaminidase enthalten (Borregaard & Cowland, 1997). Auch Defensine und kationische Peptide sind an der Abtötung von *A. fumigatus* Hyphen durch Granulozyten beteiligt (Levitz *et al.*, 1986, Okamoto *et al.*, 2004). Ein Defekt der Myeloperoxidase macht Patienten ebenfalls anfällig für *Aspergillus*- und *Candida*-Infektionen (Aratani *et al.*, 2002). Da ein Ausfall der Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate zu einer erhöhten Suszeptibilität gegen *A. fumigatus* führt, könnte auch bei neutrophilen Granulozyten dieser Abwehrmechanismus gegen *A. fumigatus* eingesetzt werden.

In immunsupprimierten Patienten kann das Auskeimen der *A. fumigatus* Konidien nicht vom Immunsystem verhindert werden und die Hyphen wachsen ins Lungengewebe ein (Ruchel & Reichard, 1999). Das invasive Wachstum von *A. fumigatus* aktiviert inflammatorische Zellen, die weitere Schäden im Gewebe verursachen (Stephens-Romero *et al.*, 2005). Schäden durch *A. fumigatus* können folglich durch Hyphenwachstum ins Gewebe entstehen, auch weil der Pilz Toxine und Proteasen sekretiert. Das von Hyphen sekretierte Gliotoxin inhibiert zwar die Zusammensetzung des NADPH Oxidasekomplexes aber nicht das Abtöten von Hyphen durch neutrophile Granulozyten (Stanzani *et al.*, 2005). Es ist in diesem Zusammenhang jedoch fraglich, ob die Konzentration des produzierten Gliotoxins im Wirt zur Inhibition der NADPH oxidase führt.

2. Reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) und ihre Rolle im Infektionsverlauf.

2.1 ROI in der Infektion, Makrophagen und Granulozyten.

Der Begriff reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) umfasst alle Moleküle, die bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff entstehen. Dazu gehören Superoxidanionen (O_2^-), Peroxidanionen (O_2^{2-}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (HO^\bullet). ROI sind in geringen Konzentrationen im Körper als sekundäre Botenstoffe tätig und werden in hohen Konzentrationen zur Pathogenabwehr produziert (Lambeth, 2004). Die durch die NADPH Oxidase gebildeten ROI sind auch an der Regulation der Mitose, Apoptose und Migration der Zellen beteiligt. Die NADPH Oxidase ist für die O_2^- Produktion von Makrophagen und Granulozyten verantwortlich (Inoguchi *et al.*, 2003, Babior, 1999). Sie katalysiert die

aktiven Zentrum zur Interaktion mit H_2O_2 . Drei Katalasen in *A. fumigatus* wurden bereits charakterisiert (Paris *et al.*, 2003b). Eine der myzelialen Katalasen Cat2, ist bifunktional als Katalase und Peroxidase aktiv. Auch Peroxidasen setzen H_2O_2 zu Wasser um, benötigen aber einen Kofaktor wie Thioredoxin, Glutathion oder die Häm-Gruppe der Katalase als Elektronendonator (Abbildung 2). Sie enthalten meist selbst Häm-Gruppen oder Cysteinreste (Selenocystein) zur Reaktion mit oxidativen Agentien. Die Deletion des Gens der sporenspezifischen Katalase *catA* in *A. fumigatus* führte zu einem H_2O_2 sensitiven Phänotyp aber keinem veränderten Abtöten der Konidien durch Alveolarmakrophagen. Die Doppeldeletion der Gene der myzelialen Katalase *cat1* und der bifunktionalen Katalase-Peroxidase *cat2* erhöhte nur unwesentlich die Sensitivität des Pilzes gegen ROI und führte zu einer geringen Attenuation im Ratteninfektionsmodell (Paris *et al.*, 2003b). Da Katalasen und Peroxidasen die einzigen Enzyme sind, die H_2O_2 direkt detoxifizieren können, kann die Bedeutung von H_2O_2 bei der Immunabwehr von *Aspergillus* Infektionen durch die Analyse der Aktivität dieser Enzyme bei der Infektion geklärt werden.

Superoxiddismutasen (Sod) katalysieren die Umsetzung von Superoxidanionen (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Abbildung 2). Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Zuerst reagiert die oxidierte Form des Enzyms mit einem Superoxidanion unter Bildung von Sauerstoff und der reduzierten Form des Enzyms. Diese Form reagiert anschliessend weiter mit einem zweiten Superoxidanion und zwei Protonen, wodurch H_2O_2 und die oxidierte Form des Enzyms entsteht. Das entstandene H_2O_2 wird anschliessend durch Katalasen abgebaut.

In *A. fumigatus* wurden bereits die Cu/Zn Superoxiddismutase und die Mn Superoxiddismutase beschrieben (Fluckiger *et al.*, 2002, Holdom *et al.*, 2000). Die Cu/Zn Superoxiddismutase ist in *A. fumigatus* extrazellulär an der Zellmembran assoziiert, weshalb bei vielen Patienten mit IA Antikörper gegen dieses Protein im Blut nachweisbar sind (Holdom *et al.*, 2000). Die Deletion des Cu/Zn Superoxiddismutasegens *sod 1* führte in *Candida albicans* zu einer gestörten Transition von Hefe- zu Hyphenwachstum und damit zu reduzierter Virulenz (Lamarre *et al.*, 2001). In *C. albicans* resultierte die Deletion der für die Katalase Cat1 und der Superoxiddismutase Sod2 kodierenden Gene in einer Reduktion der Virulenz (Chauhan *et al.*, 2006).

A. fumigatus Deletionsmutanten der Superoxiddismutasegene wurden bisher nicht charakterisiert, weshalb die Rolle dieser Enzyme bei der Virulenz noch ungeklärt ist.

In *S. cerevisiae* katalysiert das *GSH1* Genprodukt den ersten Schritt der Synthese von Glutathion. Nach Bildung des Glutathions durch GSH2 wird es durch die NADPH abhängige Glutathionreduktase reduziert. Das Thioredoxinsystem ist ähnlich aufgebaut. Es gibt zwei Thioredoxine, TRX1 und TRX2, die durch die Thioredoxinreduktase reduziert werden (Monje-Casas *et al.*, 2004). Thioredoxin und Glutathion dienen bei der Peroxidasereaktion meist als Elektronendonator.

Cryptococcus neoformans besitzt zwei nicht redundante Thioredoxingene, *trx1* und *trx2*. Eine Deletion von *trx1* führte zur erhöhten H_2O_2 und NO^\bullet Sensitivität, die *trx2* Deletion dagegen erhöhte nur die NO^\bullet Sensitivität. Beide Gene sind für die Virulenz des Pilzes essentiell

(Missall & Lodge, 2005). Die Thioredoxingene von *A. fumigatus* wurden bisher nicht näher charakterisiert oder auf ihre Rolle in der Virulenz untersucht. Die Deletion des Thioredoxingens in *A. nidulans* führte zu erheblichen Wachstumsstörungen und erhöhter Katalaseaktivität (Thon *et al.*, 2007). Der Einfluss des Thioredoxinredoxsystems auf die Virulenz von *A. fumigatus* bleibt unklar und kann durch die Analyse der ROI Stressantwort aufgeklärt werden.

2.3 Regulation der ROI Antwort durch AfYap1 und AfSkn7.

2.3.1 Der Transkriptionsfaktor Yap1p.

Yap1p ist das funktionale Homolog des AP-1 Transkriptionsfaktors in *Saccharomyces cerevisiae* und ist für die Regulation der Expression ROI detoxifizierender Gene verantwortlich (Harshman *et al.*, 1988). Die Yap1p Aminosäuresequenz enthält einen bZIP Leucinzipper zur DNA Bindung und ein Kernexportsignal (nuclear export signal/ NES) (Kuge *et al.*, 1997). Die Regulation der Aktivität von Yap1p erfolgt direkt über die Lokalisation des Proteins. Bei oxidativem Stress erfolgt die Oxidation der konservierten Cysteinreste am C Terminus, woraus eine Konformationsänderung resultiert, die das Kernexportsignal verdeckt. Das Exportin Crm1p erkennt das oxidierte Yap1p nicht und der Transkriptionsfaktor akkumuliert im Kern. Die Oxidation erfolgt stressabhängig an bestimmten Cysteinen und

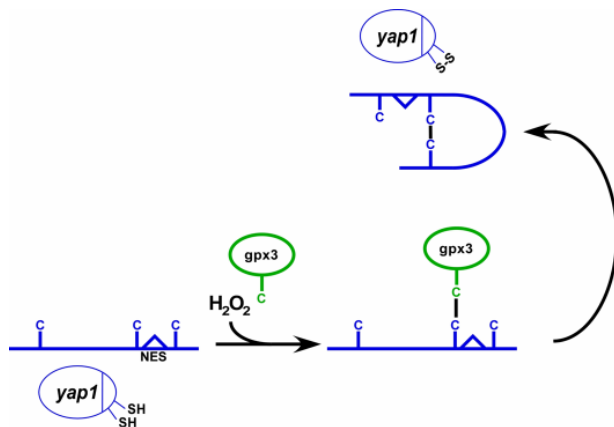


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konformationsänderung von Yap1p bei Oxidation der Cysteinreste (C) durch den Redoxtransducer Gpx3 (modifiziert nach Moye-Rowley *et al.*, 2001).

wird durch den Redoxtransducer Gpx3 vermittelt (Delaunay *et al.*, 2002, Yan *et al.*, 1998). Die Konformationsänderung bei Oxidation führt gleichzeitig zur Freilegung der DNA-Bindedomäne im Yap1p Molekül. Yap1p ist für die Regulation der ROI detoxifizierenden Gene wie z.B. Glutathion *GSH1*, *GSH2*, Glutathionperoxidase *GPX2*, Thioredoxin-reduktase *TRR1* und Glutathionreduktase *GLR1* in *S. cerevisiae* verantwortlich. Insgesamt reguliert Yap1p die Expression von über 40 Genen (Gasch *et al.*, 2000, Godon *et al.*, 1998). Yap1p bindet an der Konsensussequenz TTA(g/c)TAA

oder TTA_gTcA („Yap1 responsive element“/ YRE). Essentiell für die spezifische Yap1p Bindung ist aber anscheinend nur die Sequenz TAAxxTxA (Kuge & Jones, 1994, Wu & Moye-Rowley, 1994). Die Reduktion von Yap1p erfolgt über Thioredoxin, obwohl bisher keine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen wurde. Eine Thioredoxinreduktase- oder Thioredoxin-Mutante zeigte permanente Yap1p Kernlokalisation und eine erhöhte Expression der Yap1 Zielgene (Carmel-Harel *et al.*, 2001, Izawa *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, führte die Deletion des Thioredoxingens in *A. nidulans* zur erhöhten Katalaseaktivität (Thon *et al.*, 2007). Bei einer Regulation der Katalaseexpression

durch Yap1, zeigt die erhöhte Katalaseaktivität im Thioredoxindeletionsstamm die Interaktion von Yap1 und Thioredoxin bei oxidativem Stress. Es ist davon auszugehen, dass auch in *A. fumigatus* Yap1 und Thioredoxin zur Regulation der ROI Antwort interagieren.

Das Yap1p Homolog in *A. nidulans* Nap1 reguliert offensichtlich die Expression ROI detoxifizierender Gene, denn eine Deletion des Gens resultierte in einem H₂O₂, Menadion und tBOOH sensitiven Phänotyp (Asano *et al.*, 2007).

In *C. albicans* resultierte aus der Überexpression des zu Yap1p homologen Gens *cap1* eine besseren Überlebensrate des Pilzes bei Koinkubation mit polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten (PMN) (Chauhan *et al.*, 2006). Die *cap1* Deletion führte zu einer verzögerten, aber nicht attenuierten Virulenz in *C. albicans*. In dem pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* wurde das Yap1p Homolog direkt mit der pathogenen Entwicklung in Verbindung gebracht, da eine Deletion zu einer Virulenzreduktion führte (Molina & Kahmann, 2007). Die Rolle des zu Yap1p homologen Proteins in *A. fumigatus* bei der Regulation ROI detoxifizierender Gene und bei der Virulenz ist daher auch im Hinblick auf mögliche Therapieansätze gegen IA interessant.

2.3.2 Der Transkriptionsfaktor Skn7p.

Yap1p und Skn7p interagieren in *S. cerevisiae* bei der Regulation der Expression des Thioredoxins und der Thioredoxinreduktase (Lee *et al.*, 1999).

Skn7p wurde zuerst in Hefe identifiziert, da es die *kre9* Mutation supprimiert, die zu defekter Zellwandsynthese führt (Brown *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz von Skn7p zeigt Ähnlichkeit zum Hitzeschockprotein Hsf1p, das DNA Bindeaktivität aufweist und die oxidative Antwort der Zelle auslöst (Wiederrecht *et al.*, 1988). Skn7p wird durch Phosphorylierung in der Sln1/Skn7 Signaltransduktionskaskade aktiviert und bindet dann an der Konsensussequenz GGCTGGCC (Li *et al.*, 1998, He & Fassler, 2005). Skn7p ist alleine hauptsächlich an der Regulation von Genen der Zellwandsynthese, des Zellzyklus und der Antwort auf osmotischen Stress beteiligt. Skn7p bindet aber auch stromaufwärts des Thioredoxins *TRX2* (Morgan *et al.*, 1997), des Hitzeschockproteingens *SSA1* (Raitt *et al.*, 2000) und des Mannosyltransferasengens *OCH1* (Li *et al.*, 2002). Die Skn7p und Yap1p Zielgene zur ROI Detoxifizierung in *S. cerevisiae* sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Lee *et al.*, 1999).

Tabelle 1: Skn7p und Yap1p Zielgene in *S. cerevisiae*.

Yap1p Zielgen	Funktion	Skn7p/Yap1p Zielgen	Funktion
<i>GLR1</i>	Glutathionreduktase	<i>CCP1</i>	Cytochrom C Peroxidase
<i>GSH1</i>	Glutathion	<i>CCT1</i>	Cytosolische Katalase T
<i>TAL1</i>	Transaldolase	<i>AHP1</i>	Peroxisredoxin
<i>ZWF1</i>	Glc-6-P-DH	<i>TRR1</i>	Thioredoxinreduktase
<i>OYE3</i>	NADPH Oxidoreduktase	<i>TSA1</i>	Thioredoxinperoxidase
		<i>TRX2</i>	Thioredoxin
		<i>SOD1</i>	Cu/Zn Superoxiddismutase
		<i>SOD2</i>	Mn Superoxiddismutase

Skn7 interagiert nicht nur mit DNA sondern auch mit sich und anderen Proteinen wie z.B. Yap1p (Morgan *et al.*, 1997), Hsf1p (Raitt *et al.*, 2000), dem „cell cycle transcription factor“ Mbd1p (Bouquin *et al.*, 1999) und dem „calcium response transcription factor“ Crz1p (Williams & Cyert, 2001). Brombacher *et al.*, (2006) beschrieben die Regulation der Expression zur Glutathion- und NADPH-Produktion durch Yap1p (Lee *et al.*, 1999), wohingegen Enzyme zur Detoxifizierung von ROI durch Skn7p und Yap1p aktiviert werden (z.B. TRX, TSA und TRR) (Morgan *et al.*, 1997).

In *C. albicans* führte die Deletion des Skn7-Homologen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H₂O₂ aber nicht gegenüber Menadion. Die Deletionsmutante zeigte außerdem reduzierte Virulenz (Singh *et al.*, 2004). Die Deletion des Skn7 Homologen in *C. neoformans* führte zu einer verringerten Toleranz gegen ROI und zu reduzierter Virulenz (Wormley *et al.*, 2005). Da die Regulation vieler wichtigen ROI detoxifizierenden Gene in *S. cerevisiae* der Kontrolle von Yap1p und Skn7p unterliegt, muss zur Aufklärung der ROI Stressantwort in *A. fumigatus* auch das Skn7 Homologe charakterisiert werden.

3. Stickstoffradikale in Infektionen.

3.1 Bildung von NO Radikalen.

Zur Pathogenabwehr werden im Körper nicht nur ROI sondern auch reaktive Stickstoffintermediate (RNI) produziert (Aguirre *et al.*, 2006). Sie werden durch die NO-Synthase gebildet, die durch die Cytokine IFN- γ , TNF- α und IL1, 2 induziert wird (Fang, 1997). Kofaktoren für die als Homodimer aktive NO-Synthase sind Calmodulin, NADPH, FADH₂ und Ca²⁺. Das Enzym katalysiert unter NADPH Verbrauch die Umsetzung von Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin. Durch die Zugabe von N-Methyl-L-Arginin (L-NAME) oder N-Iminoethyl-L-Lysin kann die NO-Synthase kompetitiv gehemmt werden. Im Menschen gibt es drei NO-Synthase kodierende Gene *nos1*, *nos2* und *nos3*. Nos 1 und 3 sind in Endothelzellen konstitutiv aktiv und produzieren nur geringe Mengen NO. Die *nos2* Expression ist in Lungenepithelzellen konstitutiv aktiv, kann aber in allen Geweben durch

IFN- γ induziert werden. Deshalb spricht man auch von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Eine Infektion und Entzündung ist mit einem Anstieg der *nos2* Expression im Gewebe und damit der gesteigerten NO Produktion korreliert (Nicholson *et al.*, 1996). Bisher konnte die induzierte *nos2* Expression in Makrophagen nach Pathogenstimulus noch nicht eindeutig gezeigt werden. In neutrophilen Granulozyten dagegen konnte eine *nos2* Induktion unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden (Evans *et al.*, 1996). Interessanterweise zeigten CGD Patienten eine permanent erhöhte *nos2* Expression (Condino-Neto *et al.*, 1993). Die Rolle von NO Radikalen bei *A. fumigatus* Infektionen ist noch weitestgehend ungeklärt.

Da sowohl die NO-Synthase als auch die NADPH Oxidase durch INF- γ induziert werden, geht man davon aus, dass NO und O_2^- gleichzeitig in infiziertem Gewebe vorliegen und sich verbinden. So kann z.B. Peroxynitrit $OONO^-$, S-nitrothiol RSNO und Stickstoffdioxid NO_2^\bullet entstehen und die Zelle weitaus mehr schädigen als NO und O_2^- . Peroxynitrit entsteht durch die Interaktion von NO und Superoxidanionen O_2^- . NO_2^\bullet entsteht durch die Autooxidation von NO oder aus NO_2^- und H_2O_2 . Meist sind die Verbindungen der Radikale toxischer als der Ausgangsstoff (Fang, 1997). Eine Studie von Vazquez-Torres zeigte 1996, dass Peroxynitrit vielleicht für die anticandidielle Aktivität von Makrophagen verantwortlich ist (Vazquez-Torres *et al.*, 1996). Es zeigte sich, dass weder NO Radikale noch Superoxidanionen O_2^- in signifikant hohen Dosen durch Zellmembranen diffundieren kann, wohingegen Peroxynitrit eine gute Diffusion durch Membranen zeigte.

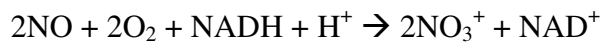
NO Radikale im Allgemeinen schädigen DNA, Peptide und Lipide der Zelle. Peroxynitrit und NO_2^\bullet können unspezifisch mit Proteinen interagieren und diese oxidieren (z.B. an Thiolgruppen, Eisen-Schwefel-Clustern (Aconitase, NADH-Dehydrogenase und Succinatdehydrogenase aber auch an Katalasen) und aromatischen Resten). Für Pathogene scheint demnach der Schutz vor NO und deren Intermediaten mit Superoxid- und Peroxidationen eine Grundvoraussetzung für die Besiedlung von Organismen zu sein.

3.2 NO Detoxifizierung.

Zum Schutz gegen NO Radikale sind dieselben Mechanismen wie bei ROI Stress aktiv. Mikroorganismen können ohne GSH nicht gegen NO-Stress bestehen. Die Glucose-6-P-Dehydrogenase ist an der Synthese von NADPH und damit indirekt an der Abwehr von Radikalen beteiligt. Superoxiddismutasen und Katalasen sind an der Detoxifizierung von ROI beteiligt und verringern so die Bildung des hoch toxischen Peroxynitrits. NO Radikale können bei geringem oxidativen Stress in Form von Nitrit und Nitrat gebunden und detoxifiziert werden. Das Flavohämoglobin Yhb1 ist spezifisch an der Detoxifizierung von NO Radikalen in *C. albicans* beteiligt. Die *yhb1* Deletion führte zu einer attenuierten Virulenz, aber bei Infektion einer *nos2*⁻ Mauslinie zeigte sich keine dem Wildtyp-ähnliche Mortalität. Man vermutet deshalb, dass Yhb1 noch an weiteren virulenzregulierenden Prozessen beteiligt ist (Hromatka *et al.*, 2005). Interessanterweise ist die Expression von *yhb1* in *C. albicans* nicht nur bei Makrophagenkontakt sondern auch in Medium mit viel Eisen induziert (Lau *et al.*,

2004a, Lau *et al.*, 2004b). In *C. neoformans* wurde die Expression der Glutathionreduktase und der Thioredoxinperoxidase unter NO Stress induziert. Eine Glutathionreduktase Genmutante ist bei Wachstum auf Agarplatten hypersensitiv gegenüber NO und avirulent im Mausmodell (Missall *et al.*, 2006).

Die Flavohämoglobin-Denitrosylase Fhb1 katalysiert die Umsetzung von NO mit Sauerstoff zu Nitrat und NAD in *C. neoformans*.



Die S-Nitrosoglutathionreduktase (Gsn1) setzt Nitrosoglutathion mit Hilfe von NADH zu Glutathion und NAD⁺ um. Bei kurzzeitig auftretendem nitrosativem Stress wird aus Glutathion Nitrosoglutathion gebildet, das dann anschließend langsam wieder zu Glutathion umgesetzt wird (Vogt *et al.*, 2003). Beide Gene sind für die Virulenz von *C. neoformans* essentiell. Die *fhb1* Deletion führte zu einem NO sensitiven Stamm mit attenuierter Virulenz im Mausmodell. iNOS^{-/-} Mäuse wurden von dem Δ *fhb1* Stamm wie der Wildtyp infiziert. Die *gsn1* Deletion zeigte keinen Phänotyp im Wildtyp. Im Δ *fhb1* Stamm führte die *gsn1* Deletion zu einer weiteren Reduktion der Virulenz (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Man kann daher davon ausgehen, dass bei der Infektion von *C. neoformans* sowohl NO als auch Nitrosoglutathion gebildet wird. Die Gsn1 und Fhb1 Homologen in *A. fumigatus* konnten im Zuge dieser Arbeit identifiziert werden. Die Aufklärung der Rolle von NO Radikalen in der Virulenz von *A. fumigatus* sollte weitere Virulenzgene erkennen lassen und damit die Therapierbarkeit von IA verbessern.

4. Proteomics.

Proteomics beschreibt die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt.

4.1 Prinzip der Auftrennung von Proteinen in zwei Dimensionen.

Das Verfahren zur Auftrennung von Proteinextrakten in zwei Dimensionen wurde 1975 durch O'Farrell und Klose entwickelt (O'Farrell, 1975, Klose, 1975). In der ersten Dimension werden die Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt in einem Gradientengelstreifen aufgetrennt. Der pI Wert ist der pH Wert, bei dem sich die negativen und positiven Ladungen eines Proteins aufheben und es nach außen hin ungeladen erscheint. Im elektrischen Feld verhält sich das Protein an diesem Punkt neutral und bewegt sich nicht. Jedes Protein hat seinen eigenen charakteristischen isoelektrischen Punkt (pI Wert). Der Streifen wird nach Reduktion mit DTT und Alkylierung mit Iodacetamid auf ein SDS-Polyacrylamid Gel (SDS-PAGE) aufgelegt und die Proteine werden in der zweiten Dimension entsprechend ihrer Größe getrennt.

Nach Aufbrechen der stabilen pilzlichen Zellwand durch Mösern in flüssigem Stickstoff hat sich die TCA/Aceton Fällung der Proteinextrakte bewährt (Nandakumar *et al.*, 2003). Um die Aggregation der Proteine an ihrem pI zu verhindern, wurden die Proteinproben in Thioharnstoff und zwitterionischen Detergentien aufgenommen (Rabilloud, 1996, Rabilloud, 1998). Um die Fokussierung zu optimieren, wurden immobilisierte pH Gradienten in den Streifen der ersten Dimension verwendet, da sich bei längeren Fokussierungszeiten auch der Gradient im elektrischen Feld bewegte (Rabilloud *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden immobilisierte pH Streifen von der Firma GE Healthcare verwendet. Trotzdem war es nötig, die 2D Gelelektrophorese und Probenaufbereitung von *A. fumigatus* Myzelien zu optimieren, um die Stressantwort des Pilzes auf Proteomebene zu analysieren. Da eine Proteomanalyse einen Blick auf den realen Zustand der Zelle in Form aller Proteine ermöglicht, kann die Reaktion auf bestimmte Stimuli zeitnah und als Endergebnis der Aktivierung bestimmter Faktoren beobachtet werden.

5. Ziele der Arbeit.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Regulation der Abwehrmechanismen von *A. fumigatus* gegen ROI, um so die Bedeutung von ROI bei der Infektion von *A. fumigatus* durch Immuneffektorzellen aufzuklären. Proteomanalysen von *A. fumigatus* nach Behandlung mit H₂O₂ sollten Aufschluss über die oxidative Antwort des Pilzes und einen Hinweis auf die Regulation der ROI Detoxifizierungsgene geben. Zur Analyse der Regulation der oxidativen Stressantwort sollten ausserdem Yap1 und Skn7 Homologe in *A. fumigatus* charakterisiert werden. Zusammen mit Promotoranalysen der putativen ROI Detoxifizierungsgene können Proteomanalysen der H₂O₂ gestressten Mutantenstämme im Vergleich zum Wildtyp Aufschluss über die Abhängigkeit der oxidativen Stressantwort von Yap1 und Skn7 geben. Nach Bestätigung der Regulation der ROI Stressantwort durch das Yap1 und Skn7 Homologe in *A. fumigatus* soll durch Koinkubationsversuche mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und den *A. fumigatus* Deletionsstämmen die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren und ihrer Zielgene beim Schutz gegen Immuneffektorzellen untersucht werden. Des Weiteren machen Proteomanalysen der *A. fumigatus* Wildtyp-Hyphen nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten es möglich, die Abwehrmechanismen des Pilzes gegen diese Zellen im Zeitverlauf darzustellen.

Da bei der Abwehr von Pathogenen neben ROI auch NO Radikale gebildet werden, sollte auch die NO Stressantwort von *A. fumigatus* in Proteomanalysen untersucht werden. Die Induktion spezifischer NO Detoxifizierungsproteine nach NO Stressinduktion könnte den Einfluss dieser Radikale beim Abwenden einer Infektion durch *A. fumigatus* aufzeigen. Der Einfluss von NO Radikalen bei der Abtötung von *A. fumigatus* durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen kann zusätzlich durch die Zugabe von NO-Synthase Inhibitoren zu dem Koinkubationsassay von Zellen mit Pilzhyphen/ Konidien untersucht werden.

Material und Methoden

1. Stämme und Medien

1.1 Verwendete *Escherichia coli* Stämme (Tabelle 2)

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F', ϕ 80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
TOP 10 F'	F' (<i>lacI</i> ^q , Tn10, Tet ^R), <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMSmcrBC</i>), ϕ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacX74</i>), <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Niederlande

1.2 Verwendete *A. fumigatus* Stämme (Tabelle 3)

Stamm	Genotyp/relevanter Phänotyp	Referenz
ATCC	Wildtyp	ATCC
<i>AfpksP</i>	<i>pksP</i>	Langfelder <i>et al.</i> , 1998
ATCCΔ <i>Afyap1</i>	<i>Afyap1::hph</i> ; Δ <i>Afyap1</i> ; Hyg ^{R,1}	diese Arbeit
ATCCΔ <i>Afyap1</i> kompl.	Δ <i>Afyap1::Afyap</i> ; Ble ^{R,2}	diese Arbeit
ATCCΔ <i>Afskn7</i>	<i>Afskn7::ptrA</i> ; Δ <i>Afskn7</i> , PtrA ^{R,3}	diese Arbeit
ATCCΔ <i>Afyap1</i> /Δ <i>Afskn7</i>	<i>Afyap1::hph</i> ; Hyg ^{R,1} <i>Afskn7::ptrA</i> ; PtrA ^{R,3}	diese Arbeit
<i>Afyap1-eGFP</i>	ATCC <i>Afyap1-eGFP</i> ; Hyg ^{R,1}	diese Arbeit
<i>otef-Afyap1-eGFP</i>	ATCC <i>otefp-Afyap1-eGFP</i> ; Hyg ^{R,1}	diese Arbeit
ATCCΔ <i>fhp1</i>	<i>fhp1::ptrA</i> ; Δ <i>fhp1</i> , PtrA ^{R,3}	Martin Vödisch
ATCCΔ <i>gno1</i>	<i>gsno1::hph</i> ; Δ <i>gsno1</i> , Hyg ^{R,1}	diese Arbeit, S. Wolke
ATCCΔ <i>gno1</i> /Δ <i>fhp1</i>	<i>fhp1::ptrA</i> ; PtrA ^{R,3} <i>gsno1::hph</i> ; Δ <i>fhp1</i> /Δ <i>gsno1</i> , Hyg ^{R,1}	diese Arbeit, S. Wolke

¹ Hyg^R: Hygromycinresistenz

² Ble^R: Phleomycinresistenz

³ PtrA^R: Pyrithiaminresistenz

1.3 Verwendete Plasmide (Tabelle 4)

Plasmid	Genotyp	Referenz
pCR2.1-TOPO	Klonierungsvektor, Amp ^R	Invitrogen, Niederlande
pUCGH	pUC18:: <i>otefp-eGFP</i> , Amp ^R , Hyg ^R	Langfelder <i>et al.</i> , 2001
pUCHph1	pUC18:: <i>hph1</i> (<i>E. coli</i>), Amp ^R	Liebmann <i>et al.</i> , 2004 b
pSK275	PtrA ^R , Amp ^R	Sven Krappmann
pSK341	Ble ^R , Amp ^R	Sven Krappmann
pAN8.1	pUC18 :: <i>gpdAp-ble</i> -NOST, Amp ^R	Sven Krappmann
TOPO- <i>Afyap1</i> -LB	pCR2.1 :: Linke Flanke <i>Afyap1</i> , Amp ^R	diese Arbeit
TOPO- <i>Afyap1</i> -RB	pCR2.1 :: Rechte Flanke <i>Afyap1</i> , Amp ^R	diese Arbeit
TOPOΔ <i>Afyap1</i>	pCR2.1Δ <i>Afyap1</i> , Amp ^R , Hyg ^R	diese Arbeit

TOPO-Afskn7-LB	pCR2.1:: Linke Flanke Afskn7, Amp ^R	diese Arbeit
TOPO-Afskn7-RB	pCR2.1:: Rechte Flanke Afskn7, Amp ^R	diese Arbeit
TOPO Δ Afskn7(Phleo)	pCR2.1 Δ Afskn7, Amp ^R , Ble ^R	diese Arbeit
TOPO Δ Afskn7(PtrA)	pCR2.1 Δ Afskn7, Amp ^R , PtrA ^R	diese Arbeit
pAN8.1-Afyap1	pAN8.1:: Afyap1, Amp ^R , Ble ^R	diese Arbeit
pUCGH-Afyap1	pUCGH:: Afyap1, otefp-Afyap1-eGFP, Amp ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
pUChph-Afyap1	pUChph::Afyap1, nativer Prom. Hyg ^R , Amp ^R	diese Arbeit
pSK275 Δ gsno-ptrA	pSK275 Δ gsno, PtrA ^R , Amp ^R	diese Arbeit
pSK275 Δ gsno-hph	pSK275 Δ gsno, Hyg ^R , Amp ^R	diese Arbeit
pSK275 Δ hfb1-ptrA	pSK275 Δ hfb1, PtrA ^R , Amp ^R	diese Arbeit

1.4 Medien und Kulturbedingungen

- LB Medium (-Agar): 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, (15g/L Agar)
- Aspergillus Minimalmedium (AMM/Glucose): 6 g/L NaNO₃, 1,52 g/L KH₂PO₄, 0,52 g/L KCL, 0,52 g/L MgSO₄; pH 6,3-6,5. Nach dem Autoklavieren 40 mL 20 % (w/v) Glucoselösung und 1 mL Spurenelementelösung (1 g FeSO₄ × 7H₂O, 8,8 g ZnSO₄ × 7H₂O, 0,4 g CuSO₄ × 5H₂O, 0,15 g MnSO₄ × 4H₂O, 0,1 g NaB₄O₇ × 10H₂O, 0,05 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O in 1L Wasser)
- Malzagar: 2 % (w/v) Malzextrakt, 0,2 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Glucose, 5mM NH₄Cl, 1mM K₂HPO₄.
- Transformationsagar: 44,75 g/L KCl, 6 g/L NaNO₃, 1,5 g/L KH₂PO₄, 15 g/L Agar, 40mL/L 20% (w/v) Glucoselösung. Nach dem Autoklavieren 2,5 mL/L 20% MgSO₄ Lösung und 1mL/L Spurenelementelösung. Je nach Bedarf 200µg/mL Hygromycin (Roche) oder 1 mg/L Pyrithiamin (Sigma).

So lange keine anderen Kulturbedingungen angegeben sind, wurden *A. fumigatus* und *E. coli* bei 37 °C schüttelnd mit 200rpm oder in Standkulturen inkubiert.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.1.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Plasmidisolation erfolgte nach einem Protokoll von Müller *et al.* (2000). Eine 3 mL LB/Amp 50 *E. coli* Kultur wurde bei 37 °C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 500µL STET Puffer/30µL Lysozymlösung resuspendiert. Nach Inkubation bei 95 °C für 1 min sind die Zellen lysiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm konnte das Zellwand-Protein Pellet mit einem Zahnstocher entfernt werden. Die DNA wurde anschliessend durch Zugabe von 500µL 96% (v/v) Ethanol und 30µL 3M Natriumacetatlösung gefällt und nach einem Waschschriff in 70% (v/v) Ethanol in 50µL 10mM TE Puffer resuspendiert.

STET Puffer: 10mM Tris HCL pH 8,0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 5% (v/v) Triton X-100

Lysozymlösung: 1% (w/v) Lysozym (MuraMinidase) in Wasser pH 8,0, Merck

2.1.2 Isolation chromosomaler DNA aus *A. fumigatus*

Die Isolation chromosomaler DNA aus *A. fumigatus* erfolgte mit Hilfe des „Epicentre DNA Purification Kits“ „Masterpure™“ gemäss dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde nach dem Trocknungsschritt in 100µL 10mM TE Puffer aufgenommen.

2.1.3 Isolation von Gesamt-RNA aus *A. fumigatus*

Die RNA Extraktion aus *A. fumigatus* Myzelien erfolgte gemäss dem Protokoll des „RNeasy MINI Kits“ (Qiagen, Hilden). Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte im Nano Drop (Thermo scientific). 10µg RNA wurden im „Northern blot“ auf eine Spur im Agarosegel geladen.

2.1.4 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung von DNA Fragmenten aus PCR oder Restriktionsverdauen in Agarosegelen wurden die Fragmente zur Weiterklonierung mit einem Skalpel unter UV Licht ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden durch Aquarienfilterwolle in ein Eppendorf Cup zentrifugiert, wodurch sich die Agarose verflüssigte. Die DNA wurde mit 96% (v/v) Ethanol gefällt und pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und nach einem Trocknungsschritt in 10mM TE /RNase Puffer aufgenommen.

2.2 Verwendung von Nukleinsäuren

2.2.1 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde in Wasser und Puffer entsprechend dem verwendeten Enzym und den Anleitungen des Herstellers verdaut (New England Biolabs, Frankfurt). Die Ligation von DNA Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend der Anleitung.

2.2.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Zur Amplifizierung von DNA Fragmenten zur Sondenherstellung oder Klonierung wurde die Goldstar Red-Taq DNA Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien) oder der Go-Taq Mastermix (Promega, Mannheim) benutzt. Bei Nichtverwendung des Go Taq Mastermixes wurden neben 5-100ng Matrizen-DNA und Primern noch 2mM dNTPs zugegeben. „Annealing“, Polymerisationszeit und Temperatur der PCR-Zyklen hingen von den verwendeten Primern und der Polymerase ab. Die Amplifizierung erfolgte in einem „T Gradient cyler“ der Firma Biometra.

In dieser Arbeit verwendete Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5

Name	Nr.	Eingeführte Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')
Yap1 neu 230	1	<i>XbaI</i>	cggttgaaagaggaccattgc
Yap2 neu 1255	2	<i>MluI</i>	cggcttatcgggtgcctcaacc
Yap3	3	<i>HindIII</i>	attaagcttgacatcatgggtcgcg
Yap4	4	<i>SfiI</i>	gtgggccatctaggccattcgggtccctcgac
Yap 10 neu	5	<i>BamHI</i>	attggatccgacgacccatgatgtcctc
Yap10B	6		cgacttcactcaaaggccg
Yap 11	7	<i>BamHI</i>	attggatccccgctctaaagcagcggagc
Yap11B	8		ggcgcggtgaactcg
Yap16	9	<i>BamHI</i>	attggatcccttcgtttcagttgccatggcgg
Yap18	10	<i>BamHI</i>	attggatccgacgactacaccgccttcag
Yap17	11	<i>BamHI</i>	attggatcccaacggcctttccaacggacc
Yap13ZIP	12		gagcgcgcagaagtc
Yap12ZIP	13		ggcctcagaatcgcg

Yap14NES	14		gacgactacaccgccttc
Yap15NES	15		cgtctgcaatccatggag
Yap ko	16		cagtgactgccatat
Yap check 1	17		gttctgctgtagtggtcggc
Skn ko1	18		gcataagtatgtgcactgattc
Skn ko2	19	<i>SfiI</i>	cagggccatctaggcccatcctggcgattaaccgg
Skn ko3	20	<i>SfiI</i>	atgggcctagatggccctgtgcaaccaccccccc
Skn ko4	21		ctaggtcagcgacgggg
Skn ko check 1	22		cgagctagagctagtgtacg
Skn kompl. For	23	<i>BamHI</i>	accggatccggtgcgggtagaataatcc
Skn kompl. Rev	24	<i>MluI</i>	acaacgcgtgcgttcattttaagtgtcgac
Gsno ko1	25	<i>XmaI</i>	gaccccgggggcccgtcacattgtcc
Gsno ko2	26	<i>SfiI</i>	cagggcctgagtggccgatgtcaacgagttcggag
Gsno ko3	27	<i>SfiI</i>	gacggccatctaggccgatacagacgagctgacg
Gsno ko4	28	<i>XhoI</i>	gaagatactcgagtttgagg
FHB ko1	29	<i>XmaI</i>	gatcccggggacagcaggcaccaatgc
FHB ko2	30	<i>SfiI</i>	gtcggcctgagtggccgatcgatttgtgggagag
FHB ko3	31	<i>SfiI</i>	gatggccatctaggcccccattgtcatgccttccc
FHB ko4	32	<i>XhoI</i>	gtcctcgaggtagcaaccaacacccaa

„Northern Sonden“

Name	Nr.	Afu Nummer	Sequenz (5' → 3')
Cat 1 for new	33	Afu2g00200	cttcctgttccagggcg
Cat1 rev new	34	Afu2g00200	gcggctggtcatactcc
Cat2 for	35	Afu8g01670	cgatctcctgatcctacc
Cat2 rev	36	Afu8g01670	ccaggacgatgagatcagc
UGP1 for	37	Afu7g01830	ctcgggtggagttcctgaac
UGP1 rev	38	Afu7g01830	ggtccatgacgagctgac
AspF3 (Prx1) for	39	Afu6g02280	gacagcttcccctctgac
AspF3 (Prx1) rev	40	Afu6g02280	ccctcctcatcgccc
SOD 1 for	41	Afu5g09240	ccagtcattgtgtcctc
SOD 1 rev	42	Afu5g09240	cggcgataccaatgacac
Zn SOD for	43	Afu1g11640	gtctcgtatcgtctggcc
Zn SOD rev	44	Afu1g11640	gacagatccgacgagctg
SOD B for	45	Afu4g11580	gacctatgtcaacagctacaa
SOD B rev	46	Afu4g11580	gatgccaatgtgtccgt
Trr1 for	47	Afu4g12990	ctatctgtcgagagcggaac

Trr1 rev	48	Afu4g12990	gtgcctggcttggtgatg
Glr1 for	49	Afu1g15960	gtggaaagtggacgggc
Glr1 rev	50	Afu1g15960	cccacagcagctcgttg
Pnr1 for	51	Afu5g09910	ctggagctggtcaaggc
Pnr1 rev	52	Afu5g09910	ggcagggatgttcagg
G6P DH for	53	Afu3g08470	gaggagcagctggacag
G6P DH rev	54	Afu3g08470	cactcggataaccaactcg
FHB for	55	Afu8g06080	gcactacaggagcatggg
FHB rev	56	Afu8g06080	cgaatccctcgactctc
Gsno for	57	Afu2g01040	gatgcctacacactgtctg
Gsno rev	58	Afu2g01040	caacccttggtggcaggc
Fhp1 for (MV)	59	Afu4g03410	cggccaccaagctcgtg
Fhp1 rev (MV)	60	Afu4g03410	cgttggtggcatcatccagg

2.2.3 Sondenmarkierung ECL

Die Sondenmarkierung für „Southern blot“-Analysen erfolgte mit dem „ECL Labeling Kit“ entsprechend den Anweisungen des Herstellers (GE Healthcare, Freiburg). Hierzu wurde ein spezifisches DNA Fragment mit Hilfe der Klenow Polymerase mit Fluoreszein gekoppelten dUTPs markiert.

2.2.4 Sondenmarkierung mit DIG

Zur Sondenmarkierung für „Northern blot“-Analysen wurde ein spezifisches DNA Fragment per PCR amplifiziert und mit Digoxigenin gebundenen dUTPs markiert. Markierte dUTPs und der Detektionskit wurden entsprechend der Herstellerempfehlung eingesetzt (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.2.5 „Southern blot“

Zur Detektion der Integration eines Deletionskonstruktes oder zum Nachweis der Mehrfachintegration eines DNA Konstruktes zur Überexpression eines Gens in die chromosomale DNA von *A. fumigatus* wurden „Southern blot“-Analysen durchgeführt (Southern, 1975). Hierzu wurde die isolierte und verdaute DNA in einem 1 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und das Gel in 0,25 M HCL Lösung 15 Minuten denaturiert. Die Denaturierung erfolgte in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH Lösung für 15 Minuten. Nach der Neutralisierung in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris HCL, pH 7,5 für 15 Minuten erfolgte die DNA Übertragung auf eine Hybond N⁺-Membran im Kapillarblotverfahren (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA wurde anschliessend in einem UV „crosslinker“ der Firma Hoefer mit 1200 Joule kovalent auf die Membran gebunden. Die Hybridisierung mit der Fluoreszein markierten Sonde und die Bandendetektion erfolgten bei 60 °C in Hybridisierungspuffer gemäss den Angaben des Herstellers (10 mL 10 x SSC, 1mL Liquid Block (GE Healthcare, Freiburg), 200µL 10 % (w/v) SDS, 1g Dextransulfat, 200µL Heringssperma DNA (10mg/mL), add. 20 mL H₂O).

2.2.6 „Northern blot“

10µg RNA wurden 1:1 mit Auftragspuffer versetzt und 10 Minuten bei 60 °C erhitzt. Die Proben wurden anschliessend sofort auf Eis gestellt und auf ein 1,2 % (w/v) Agarose/RP Gel aufgetragen.

RP Puffer: 200mM MOPS, 50mM Na-Acetat, 10mM EDTA, pH 7.

Zur Herstellung des Elektrophoresepuffers wurden 200mL RP Puffer mit 30mL 37% (v/v) Formaldehydlösung und Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Das 1,2 %-ige (w/v) RNA Gel wurde mit 30mL RP Puffer, 1,8g Agarose, 120mL Wasser aufgekocht und nach dem Abkühlen mit 8mL 37% (v/v) Formaldehydlösung versetzt. Der RNA Probenpuffer bestand aus 4mL RP Puffer, 1,4mL 37% (v/v) Formaldehydlösung, 5mL Formamid, 800µL DNA Auftragspuffer (New England Biolabs), 500µL Glycerin und 15µL Ethidiumbromid. Die Auftrennung der RNA erfolgt bei 90V über 2 Stunden. Das Gel wurde in 10 x SSC zweimal 15 Minuten äquilibriert und anschliessend mit 10 x SSC auf eine Hybond N⁺ Membran (GE Healthcare, Freiburg) gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte gemäss den Anweisungen des „Dig Hyb Kits“ bei 60 °C über Nacht (GE Healthcare, Freiburg). Die Detektion erfolgt nach Blocking und Antikörperinkubation auf einem Röntgenfilm der Firma AGFA. Die Expositionszeit variierte zwischen 30 sec-15 Minuten.

2.2.7 Transformation von *E. coli*

E. coli wurde zur Amplifizierung von Plasmiden gemäss der RbCl Methode von Sambrook *et al.* (1989) transformiert.

2.2.8 Transformation von *A. fumigatus*

Die Transformation von *A. fumigatus* erfolgte nach dem Protokoll von Balance und Turner (1985). Myzel aus einer AMM/Glucose Übernachtskultur wurde nach einem Waschschrift in 0,6M KCl, 50mM CaCl₂ in Glucanexlösung (20mL 0,6M KCl, 0,4g Glucanex) bei 28 °C protoplastiert. Nach einer Stunde wurde das Restmycel von den Protoplasten getrennt. Es folgten mehrere Waschschriffe in 0,6M KCl, 50mM CaCl₂ und eine Zentrifugation bei 4000 rpm. Die Transformation erfolgte mit mindestens 6µg DNA und 20µL PEG Lösung (25 % (w/v) PEG, 50mM CaCl₂, 10mM Tris) auf Eis. Nach 20 Minuten wurden 500µL PEG Lösung zugegeben, um überschüssige DNA zu fällen. Nach der Zugabe von 1mL 0,6 M KCL, 50mM CaCl₂ Lösung wurde der Transformationsansatz auf 4 Transformationsagarplatten verteilt und im Topagar aufgegossen. Der Transformationsagar (20g/l Agar, 0,6M KCl, 6g/L NaNO₃, 1,52g/L KH₂PO₄, 0,5g/L MgCl₂, 40mL/L 20% (w/v) Glucose und 1mL/L Spurenelementlösung) enthielt 100 µg/mL Hygromycin oder 80µg/mL Pyriithiamin zur Selektion der Tranformanten.

3. Biochemische Methoden

3.1 Enzymaktivitätsbestimmung

3.1.1 Präparation von nativen Proteinextrakten

Zur Extraktion nativer Proteinextrakte zur Aktivitätsbestimmung der Katalase, der Thioredoxinreduktase und der Glutathionreduktase wurde eine Übernachtskultur zur Stressinduktion herangezogen. Zur Induktion von oxidativem Stress wurden 2mM Diamid, H₂O₂, Menadion oder tBOOH der Kultur zugegeben und nach Ablauf der Induktionszeit wurden Teile der Kultur geerntet. Nach dem Zellaufschluss unter flüssigem Stickstoff im Mörser wurden 100mg Mycel mit 500µL 100mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit dem Vortex geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm bei 4 °C wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford (1976) bestimmt gemäss den Anleitungen des Herstellers (BioRad laboratories, München) im Photometer (Ultraspec 3100pro; GE Healthcare).

3.1.2 Bestimmung der Thioredoxinreduktaseaktivität

Nach Herstellung eines nativen Proteinextrakts wurde die Thioredoxinreduktaseaktivität im Photometer bestimmt. 10µL Rohextrakt wurden zu 100mM Kaliumphosphatpuffer in einer Küvette gemischt. Anschliessend wurden 3µM Thioredoxin (aus *A. nidulans*, gereinigt von Marcel Thön) und 2µM NADPH (Sigma Aldrich) bis zu einem Endvolumen von 1mL

zugegeben. Die Abnahme der Absorption bei 340nm wurde im Photometer über die Zeit gemessen und anhand der Steigung das ΔE berechnet. Mit dem spezifischen Extinktionskoeffizienten von NADPH $\epsilon = 6,22$ wurden die Volumenaktivität und die Spezifische Aktivität der Thioresoxinreduktase nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

3.1.3 Bestimmung der Katalaseaktivität photometrisch und im Gel

Die Katalaseaktivität in nativen Proteinextrakten wurde im Gel nach Goldberg und Hochmann (1989) bestimmt. Nach der Auftrennung der Proteine des nativen Proteinextrakts wurde das Gel 1h in 100mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3 geschwenkt. Anschliessend wurde das Gel in 50mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3/ 5mM H_2O_2 10 Minuten inkubiert und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Nach einer 10 minütigen Inkubation des Gels in 50mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,3/ 20 μ g/mL Meerrettich Peroxidase (Sigma Aldrich) wurden 0,5mg/mL Diaminobenzidin zugeben. Das Gel verfärbte sich braun, nur Katalasebanden blieben ungefärbt, da die Katalasen das H_2O_2 abgebaut hatten.

Die photometrische Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte nach der Verdünnung von 50 μ L Proteinextrakt in 950 μ L 50mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5. Nach der Zugabe von 2 μ L 30%iger (v/v) H_2O_2 Lösung (20mM Endkonzentration) (Fluka, München) wurde die Absorption bei 240nm im Photometer bestimmt (UV Küvetten, Iso9001; Brand) und die Katalaseaktivität berechnet (Thon *et al.*, 2007).

3.2 2D Gel Elektrophorese

3.2.1 Isolation von Proteinextrakten aus Myzel

Die Optimierung der Proteinextraktion erfolgte wie von Kniemeyer *et al.* (2006) beschrieben. Zur Solubilisierung der Proteine wurde Lysepuffer III (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) Zwittergent, 0,8 % (w/v) Ampholyte, 60mM DTT, 40mM Tris) für alle 2 D Gele verwendet. Bei der Verwendung von DIGE Farbstoffen wurde der Lysepuffer ohne DTT und Ampholyte benutzt, da sie die Bindung der DIGE-Farbstoffe an die Proteine störten. Nach der Markierungsreaktion wurden diese Stoffe dem Proteinansatz zugegeben. Die Proteinaufreinigung erfolgte mit einer Phenol-Ammoniumacetat Fällung. Hierbei wurden 100mg Mycel mit 500 μ L Extraktionspuffer (0,3g Tris, 0,1g EDTA, 0,375g KCl, 0,5g DTT, 15g Saccharose in 50mL pH 8,5) mittels Vortex gemischt. Nach Zugabe von 500 μ L Phenol schloss sich eine 20 minütige Inkubation bei 4 °C im Vortex an. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 15000rpm, 4 °C konnte die Phenolphase in ein neues Eppendorff Gefäss überführt und mit 500 μ L Extraktionspuffer erneut gemischt werden. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Phenolphase in einem neuen Eppendorffgefäss mit 1,5mL 100mM Ammoniumacetat/Methanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation mit 4000rpm für 15 Minuten bei 4 °C konnte das Proteinpellet anschliessend mehrfach mit Aceton gewaschen werden. Das Proteinpellet wurde zuletzt in 300 μ L Lysepuffer III durch 10 minütige Ultraschallbehandlung gelöst. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford mit Hilfe der BioRad Bradford Lösung gemäß den Angaben des Herstellers (BioRad, München).

3.2.2 Proteinextrakte aus *A. fumigatus* Hyphen nach Koinkubation mit PMNs

Nach Ablauf der Koinkubationszeit von Granulozyten und Hyphen wurde 1mL Probe 1 Minute bei 1700 rpm zentrifugiert. Die meisten Granulozyten befanden sich anschliessend im Pellet, so dass die Pilzhypen mit einer Pipette abgenommen werden konnten. Die restlichen Granulozyten wurden durch mehrmaliges Waschen der Hyphen mit eiskaltem Wasser und 0,3% (v/v) Triton X-100 lysiert und entfernt. Nach den einzelnen Waschschritten wurde die Probe jeweils bei 4000 rpm 1 Minute zentrifugiert, um die Hyphen zu pellettieren. Das Hyphenpellet wurde anschliessend in flüssigem Stickstoff gefroren. Der Hyphenaufschluss

erfolgte mit Hilfe des „Sample Grinding Kits“ (GE Healthcare, Freiburg) und einer Handbohrmaschine (Bosch). Anschliessend wurde die Probe 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe des „Clean Up Kits“ von GE Healthcare (Freiburg) aufgereinigt und die Proteine wurden gemäss den Anleitungen des Herstellers gefällt. Das Proteinpellet wurde in 50µL Lysepuffer III (ohne DTT und Ampholyte) aufgenommen. Nach Einstellen des pH Werts mit 50mM NaOH Lösung auf pH 8,0 wurden die Proteinproben gemäss den Anweisungen (300pmol Farbstoff/50µg Protein) DIGE gefärbt (GE Healthcare, Freiburg) und auf die IPG Streifen der ersten Dimension aufgebracht.

3.2.3 Isolation von Proteinextrakten aus Kulturüberstand

Zur Isolation der sekretierten Proteine unter oxidativem Stress wurde eine über Nacht AMM/Glucose Kultur über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschliessend mit 2mM Diamid inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C im Schüttler. Der Kulturüberstand wurde mit TCA bei 4 °C über Nacht gefällt und anschliessend mehrfach mit Aceton gewaschen. Das Proteinpellet wurde in Lysepuffer III aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben erfolgte mit Hilfe der Bradford Lösung (BioRad, München) und einer BSA Eichreihe, die mit dem BSA Standard (BioRad, München) gewonnen wurde.

3.2.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Vor der isoelektrischen Fokussierung der Proteine wurden die 24 cm IPG Streifen (GE Healthcare, Freiburg) mit 450µL Rehydrierungspuffer (7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 2 % (v/v) CHAPS, 1 % (v/v) Zwittergent, Destreak, IPG buffer) über Nacht vorgequollen. Der zugegebene IPG Puffer richtete sich nach dem pH Gradienten des IPG Streifens. Bei Auftragen der 250-300µg Probe mittels „Cup Loading“ wurde die Proteinprobe nach dem Quellen der Streifen mit Hilfe eines Cups auf den Streifen aufgebracht und im Spannungsfeld langsam in den Streifen eingebracht. Die Proteinprobe kann auch per „Rehydration Loading“ in den Streifen direkt mit eingequollen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht Destreak und DTT zugleich in einer Lösung zusammen verwendet werden. Statt der Destreak Lösung wurde in diesem Fall DTT zugegeben. Die Fokussierung der Proben erfolgte gemäss dem Handbuch „2-D-Electrophoresis, Principles and Methods“ (GE Healthcare).

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen in Äquilierungspuffer (5 M Tris, 87 % (v/v) Glycerol, 7M Harnstoff, 20 g/L SDS und 1 % (w/v) DTT bzw. 2,5% (w/v) Iodacetamid) jeweils 15 Minuten inkubiert.

3.2.6 Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension

Die 12,5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid Gele wurden in einer Ettan Dalt 6 Kammer gemäss den Anweisungen des Herstellers gegossen (GE Healthcare) (Gorg *et al.*, 2004). Zur Untersuchung von NO Stress wurden die Gele im Gradientengelgiesser mit einem Acrylamid/Bisacrylamid Gradienten von 10 bis 15 % (v/v) hergestellt (Gradientengelgiesser: „a2DEoptimizer“; BioRad).

Die Auftrennung der Proteine nach Grösse erfolgte bei 1 Watt/Gel für 30 Minuten und anschliessend bei 15 Watt/Gel für etwa 4 Stunden in der Ettan Dalt 6 Kammer für 24 cm Gele in 1 x SDS Laufpuffer (GE Healthcare, Freiburg).

Anschliessend wurden die Gele mindestens eine Stunde in Fixierlösung inkubiert (40% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure).

3.2.7 Detektion von DIGE Farbstoffen

Die Detektion von DIGE Farbstoffen erfolgte im Typhoon Scanner „Typhoon multicolor fluorescence and phosphor image scanner“ (GE Healthcare, Freiburg). Die Gele wurden mit einer Auflösung von 100 microns eingescannt, um eine optimale Spotdetektion zu ermöglichen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Laser der Wellenlängen 532 nm (grün) für Cy3, 633 nm (rot) für Cy5 und 488 nm (blau) für Cy2 wurde je nach Beladungsstärke des jeweiligen Gels eingestellt.

3.2.8 Nachfärbung von 2D Gelen

3.2.8.1 Colloidal Coomassie

Die Färbung der 2D Gele erfolgte mit Coomassie brilliant Blue G-250 gemäss dem Protokoll von Neuhoff *et al.* (1988).

3.2.8.2 Ruthenium

Die Nachfärbung der 2D Gele mit Ruthenium erfolgte nach der chemischen Synthese des Farbstoffes durch Olaf Kniemeyer und Robert Winkler nach Rabilloud *et al.* (1996). Die optimierte Färbung mit Ruthenium erfolgte nach der Fixierung in 30% (v/v) Methanol/10 % (v/v) Essigsäure und drei Waschschritten für je 30 Minuten in Wasser in 40% (v/v) Methanol /10% (v/v) Essigsäure, 1µM Ruthenium für mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Gele wurden anschliessend 20 Minuten in 40% (v/v) Methanol/10% (v/v) Essigsäure entfärbt und 10 Minuten in Wasser gewaschen. Die Detektion erfolgte mit 610 nm und dem Sypro Ruby Filter im „Typhoon“ Scanner (GE Healthcare, Freiburg). Die Proteinspots wurden unter dem „Dark Reader“ (MoBiTec) mit der Pipettenspitze gepickt und anschliessend tryptisch verdaut (Shevshenko *et al.*, 1995).

3.2.8.3 Silber

Die Silberfärbung der 2D Gele erfolgte nach dem Protokoll von Klose (Klose & Kobalz, 1995) unter Berücksichtigung der Änderungen nach Yan (Yan *et al.*, 2000).

Silbergefärbte Spots wurden vor dem Trypsinverdau in 15mM K-Ferricyanid, 50mM Na-Thioresulfatlösung für etwa 30 Minuten entsilbert und anschliessend 1 Stunde in Wasser gewaschen.

3.2.9 Auswertung von 2D Gelen

Die Auswertung der DIGE Gele erfolgte mit Hilfe der „Decyder Software“ (GE Healthcare, Freiburg). Coomassie gefärbte Gele wurden mit der Δ2D Software (Decodon) ausgewertet. In beiden Fällen wurden Spots mit einem Schwellenwert von unter der zweifachen Standardabweichung (meist 1,5) als nicht signifikant betrachtet.

3.3 Sensitivitätstest gegen ROI

3.3.1 Hemmhofagarplattenassay

Um die Sensitivität von *A. fumigatus* gegen verschiedene Agentien zu testen, wurden 10mL Bottomagar (AMM/Glucose) in eine Petrischale gegossen. Nach Erkalten des Agars wurden 10⁶ Konidien des zu testenden Pilzstammes mit 10mL Topagar (AMM/Glucose) vermischt und auf den Bottomagar gegossen. Nach Erkalten des Agars wurde ein 1cm grosses Loch aus dem Agar gestanzt und mit 150µL 3 % (v/v) H₂O₂ Lösung (Fluka), 1mM Menadionlösung (Sigma Aldrich, München), 0,1M Diamidlösung (Sigma Aldrich, München), 0,08 M DETA NO (Sigma Aldrich, München) oder 0,08 M DEA (Sigma Aldrich, München) gefüllt. Die Agarplatten wurden anschliessend 18 Stunden bei 37 °C inkubiert und der Inhibitionsradius wurde mit dem Lineal ausgemessen. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Doppelbestimmungen.

3.3.2 Tropfplattentest

Die Sensitivität von *A. fumigatus* gegen Congo red, Amphotericin B und Imidazol wurde in einem Tropfassay bestimmt. Der zu testende Stoff wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in AMM/Glucose Agar eingegossen und nach Erkalten des Agars mit einer Verdünnungsreihe von *A. fumigatus* Konidien beimpft. Die getesteten Konzentrationen, bei denen Wachstumsinhibition von *A. fumigatus* beobachtet wurde, betrugen: 1-10 µg/mL Amphotericin B (Sigma Aldrich); 15-25 µg/mL Imidazol (Sigma Aldrich) und 40-100 mg/mL Congo red (Sigma Aldrich). Die Auszählung der Sporen erfolgte mit dem Cell-counter CASY TT (Innovatis, Reutlingen). Es wurden jeweils 5 µL Sporensuspension mit 5 µL 1% (w/v) Agar/AMM zu einer absoluten Konzentration von 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 Sporen verdünnt und aufgetropft. Anschliessend wurden die Agarplatten 18-40 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Isolation von PMNs

Die Isolation der Granulozyten aus Frischblut erfolgte nach dem Protokoll von Wozniok *et al.* (2008). Nach der Gradientenzentrifugation des Blutes in „Polymorphpräp^R“ (Axis Shield, England) wurden die Granulozyten abgenommen und durch Lyse der Erythrozyten in ACK Puffer (Invitrogen) aufgereinigt. Die Koinkubation mit *A. fumigatus* Hyphen erfolgte in RPMI/ 5% (v/v) FKS (Sigma Aldrich, München). Die Hyphen wurden in RPMI/ 5% (v/v) FKS bei 37 °C 8 Stunden vorgezogen und durch Zentrifugation bei 4000rpm geerntet.

4.2 Koinkubation von PMNs mit *A. fumigatus*

Die Koinkubation von Granulozyten und Hyphen erfolgte in einem Zahlenverhältnis von 1:10 oder 1:1 (je nach Versuch) bei 37 °C ruhend in RPMI / 5% (v/v) FKS.

5. Cytologische Methoden

5.1 Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie

Mikroskopische Analysen wurden mit einem Zeiss Axis Mikroskop durchgeführt (Zeiss, Jena). Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leica DM4500B (Leica Microsystems, Bensheim). Bilder wurden mit der Mikroskopkamera Leica DFC 480 (Leica Microsystems, Heerbrugg) erhalten und mit der Software „Leica Application Suite 2.5.0R1“ bearbeitet.

6. Mausinfektionsmodell

Um die Infektionsrate von *A. fumigatus* im Mausmodell zu bestimmen wurden weibliche 18-20 g schwere Mäuse (BALB/c) mit 100mg/kg Cyclophosphamid (Sigma Aldrich, München) an Tag -4, -1, 2, 5, 8, 11 immunsupprimiert. An Tag -1 vor der Infektion erhielten die Mäuse zusätzlich 200mg/kg Cortisonacetat (Sigma Aldrich, München) subkutan. Die *A. fumigatus* Konidien wurden in PBS/0,1% (v/v) Tween 80 (Merck) geerntet und über Miracloth (Calbiochem) gefiltert. Nach der Betäubung der Mäuse mit 200 µL/ 20g Körpergewicht 1% (v/v) Ketamin (WDTeG) 0,02% (v/v) Rompun (Bayer) wurden sie mit 25 µL Konidiensuspension intranasal infiziert. 25 µL Konidiensuspension enthielten 5×10^3 Konidien. Das Überleben der Mäuse wurde mehrfach täglich überprüft. Schwer erkrankte Tiere wurden mit 200 µL 3,2 % (v/v) Narcon (Rhone Merieux) getötet. Die Infektionsversuche erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von B. Hube (I. Jacobsen), HKI, Jena. Im „Cortisonacetat“ Modell wurden etwa 25 g schwere Mäuse mit 1,25 g/kg Körpergewicht Cortisonacetat am Tag -3 und 0 immunsupprimiert. Die Infektion erfolgte mit 10^5 *A. fumigatus* Konidien in 20 µL PBS intranasal.

Ergebnisse

1. Optimierung der 2D-Gelelektrophorese von Proteinextrakten aus *A. fumigatus*.

Um die direkte Antwort von *A. fumigatus* auf sich ändernde Umweltbedingungen zu verfolgen, wurde die Proteinisolation und Auftrennung der Proteine im 2D-Gel optimiert. Die Aufreinigungsmethode der Proteinextrakte bestimmt maßgeblich die Qualität und Anzahl der detektierbaren Spots und damit die Auswertbarkeit der 2D-Gele.

1.1 Proteinisolation aus *A. fumigatus*.

Zur Optimierung der Proteinisolation wurde *A. fumigatus* in AMM/Glucose über Nacht bei 37 °C angezogen, das Myzel nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser mit Pistill aufgeschossen. 50 mg aufgebrochenes Myzel wurden direkt in 300µL SDS Lysepuffer resuspendiert (Abbildung 4/1). Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand unverzüglich zum Beladen eines IPG strips benutzt (7cm; 3-11 pH). Zum Vergleich wurden 50 mg Myzel mit dem „Clean Up Kit“ von GE Healthcare aufgereinigt und die Proteine ebenfalls auf einen 7cm Streifen mittels „Cup loading“ geladen (Abbildung 4/2). Die dritte

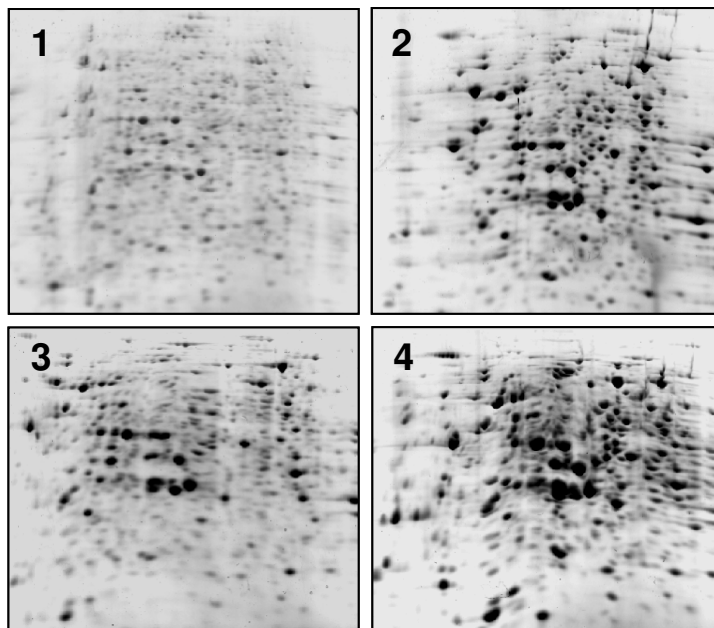


Abbildung 4: Optimierung der Proteinextraktionsmethoden. Coomassie gefärbte Minigele (7cm), pH 3-11. Proteinextraktion mit SDS (1), „Clean Up Kit“ (2), SDS/„Clean Up Kit“ (3) oder TCA/Aceton Fällung (4).

Methode kombinierte die Proteinextraktion in einem SDS Puffer und die anschließende Aufreinigung der Probe mittels „Clean Up Kit“ (Abbildung 4/3). Eine direkte Fällung der Proteine mit TCA/Aceton führte zur Isolation von Probe 4 (Abbildung 4/4). Nach der Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension wurden die Minigele mit colloidalem Coomassie gefärbt. Abbildung 4 zeigt die 2D-Gele der unterschiedlichen Aufreinigungen im Vergleich. Die Qualität der Probenisolation konnte durch Vergleich der Deutlichkeit der Proteinspots und Verringerung der

Streifenbildung im Gel bestimmt werden. Die Aufreinigung mit Hilfe des „Clean Up Kits“ ergab deutliche Spotgrenzen, wenig Streifenbildung und minimalen Hintergrund im Gel (Abbildung 4/1). Auch die TCA/Aceton Fällung (Abbildung 4/4) ergab eine klare Auftrennung und eine deutlich höhere Anzahl detektierbarer Spots.

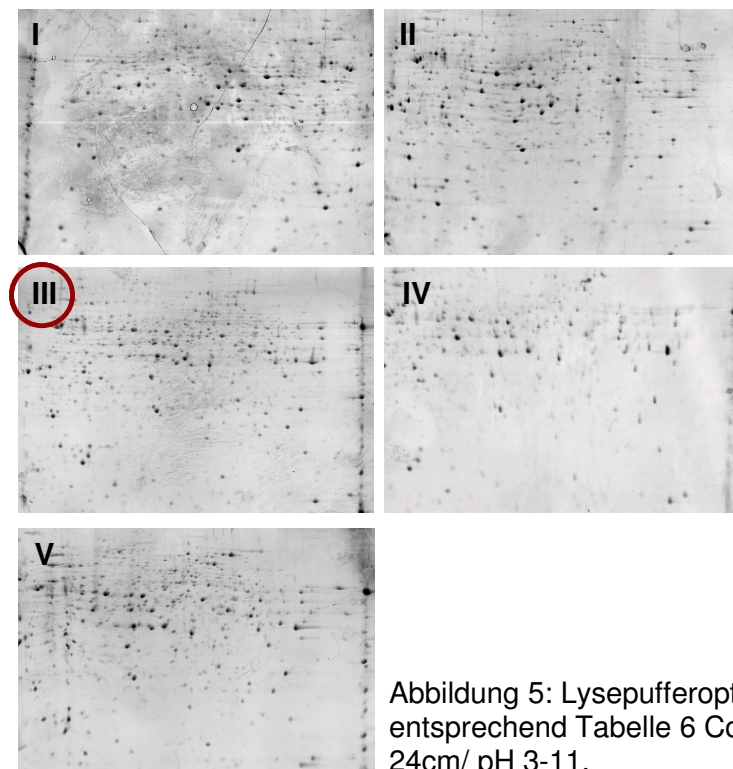
1.2 Proteinsolubilisierung in unterschiedlichen Lysepuffern.

Beim Lösen des Proteinpellets nach Aufreinigung der Proteine aus der Myzelprobe kann die Zugabe von Detergenzien die Löslichkeit der Proteine erhöhen. Deshalb wurden Proteinproben in fünf unterschiedlichen Lysepuffern solubilisiert und in 2D-Gelen verglichen. Die Proteinextraktion erfolgte mit Hilfe des „Clean Up Kits“ (GE Healthcare). Die Lysepufferzusammensetzung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 Lysepuffer zur Solubilisierung der Proteine.

Lysepuffer	I	II	III	IV	V
Harnstoff	9M	7M	7M	7M	7M
Thioharnstoff	-	2M	2M	2M	2M
CHAPS (v/v)	4%	4%	2%	-	1%
Zwittergent 3-10	-	-	1%	-	0,5%
ASB 14	-	-	-	1%	0,5%
Ampholyte (v/v)	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%
DTT	60mM	60mM	60mM	60mM	60mM
Tris	40mM	40mM	40mM	40mM	40mM

Das Proteinpellet aus der „Clean Up Kit“ Aufreinigung wurde in jeweils 200µL Lysepuffer aufgenommen und im Ultraschallbad 10 Minuten gelöst. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford, 1976) wurden 200µg Probe mittels „Cup loading“ auf einen 24 cm IPG Steifen (pH 3-11) geladen. Abbildung 5 zeigt den Vergleich der



unterschiedlichen Lysepuffer im 2D-Gel. Spots mit den schärfsten Spotgrenzen und wenig Hintergrund wurden mit Lysepuffer II und III detektiert (Abbildung 5). Da die Proteinprobe in Lysepuffer III mehr Spots auf dem Gel zeigte, wurde dieser Lysepuffer für die weiteren 2D-Gelanalysen von *A. fumigatus* verwendet.

Abbildung 5: Lysepufferoptimierung. Lysepuffer entsprechend Tabelle 6 Coomassie gefärbte 2D-Gele 24cm/ pH 3-11.

2. AfYap1 vermittelte Stressantwort von *A. fumigatus* auf ROI.

2.1. Oxidativer Stress in *A. fumigatus*.

In frühen Stadien der *A. fumigatus* Infektion werden die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus durch Alveolarmakrophagen und Granulozyten repräsentiert, die die Konidien schon in der Lunge attackieren (siehe Einleitung). Es konnte gezeigt werden, dass zum Abtöten einiger Pathogene wie z.B. *Candida albicans* und *Staphylococcus aureus* die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) in den Immuneffektorzellen induziert wird. Da Patienten mit defekter NADPH Oxidase, die zur Produktion von ROI essentiell ist, vermehrt an IA erkranken, lag die Vermutung nahe, dass ROI auch zur Abwehr von *A. fumigatus* gebildet werden. Die erfolgreiche Infektion setzt deshalb die Fähigkeit des Pathogens voraus, sich gegen ROI zu schützen. Die Antwort von *A. fumigatus* auf oxidativen Stress wurde deshalb mittels Proteomanalysen untersucht.

Die Regulation von ROI detoxifizierenden Proteinen erfolgt in *Saccharomyces cerevisiae* durch den Transkriptionsfaktor Yap1p. Um die Rolle der ROI Abwehr bei Infektionen durch *A. fumigatus* zu untersuchen, wurde das Yap1p Homolog in *A. fumigatus* identifiziert und molekularbiologisch charakterisiert. Für die Redoxregulation von Yap1p ist das Thioredoxinsystem in *S. cerevisiae* essentiell, so dass auch dessen Regulation in die Untersuchungen miteinbezogen wurde. Bei Induktion des Thioredoxinsystems unter oxidativem Stress, wird Yap1 ebenfalls aktiviert.

2.1.1. Induktion der Thioredoxinreduktase durch 2mM H₂O₂.

Ein Schlüsselenzym zum Abbau von ROI ist die Thioredoxinreduktase Trr1 (siehe Einleitung). Um den genauen Zeitpunkt der Induktion der generellen oxidativen Stressantwort zu ermitteln, wurde deshalb die Aktivität der Trr1 nach Stressinduktion mit H₂O₂ und Diamid in nativen Proteinextrakten bestimmt. Aus einer AMM/Glucose Übernachtskultur wurde nach Zugabe von 2mM H₂O₂ bzw. 2mM Diamid zu unterschiedlichen Zeitpunkten Myzel entnommen und zur Proteinisolation verwendet. Die Reduktion von Thioredoxin durch die Thioredoxinreduktase ist eine NADPH-abhängige Reaktion. Die Trr1 Aktivität lässt sich aufgrund der spezifischen Absorption von NADPH im Photometer detektieren. Nach Erstellen eines nativen Proteinextrakts in Kaliumphosphatpuffer wurde nach Zugabe von aufgereinigtem Thioredoxin aus *A. nidulans* (isoliert von Marcel Thön) und NADPH die Abnahme der Absorption bei 340nm gemessen (Thon *et al.*, 2007). Unter Berücksichtigung des spezifischen Extinktionskoeffizienten für NADPH (ϵ_{NADPH} : 6,22 mM⁻¹cm⁻¹) wurde entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz aus der Abnahme der Extinktion (ΔE) die spezifische Thioredoxinreduktaseaktivität A_{spec} berechnet (Abbildung 6).

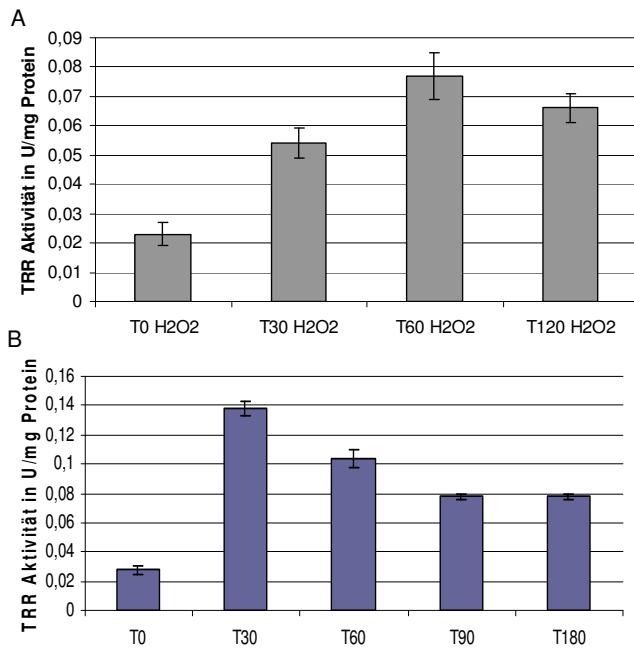


Abbildung 6: Thioredoxinreduktaseaktivität nach Induktion mit 2mM H₂O₂ (**A**) oder 2mM Diamid (**B**). Die Trr1 Messwerte beziehen sich auf die spezifischen Enzymaktivität U/mg Protein.

Die Enzymaktivitäten sind in Abbildung 6A/B schematisch dargestellt. Schon 30 Minuten nach H₂O₂ Zugabe zeigte sich eine deutlich gesteigerte Thioredoxinreduktaseaktivität. Wobei die Aktivitäten insgesamt bei Induktion durch H₂O₂ deutlich schwächer detektiert wurde als bei Zugabe von Diamid. Die Aktivität erreichte 60 Minuten nach H₂O₂ Zugabe ihren Höhepunkt. Nach Zugabe von Diamid wurde die Thioredoxin-reduktaseaktivität schon nach 30 Minuten maximal induziert. Im Zeitverlauf der Diamidinduktion wurde insgesamt eine stärkere und länger anhaltende Induktion der

Thioredoxinreduktase beobachtet. Diamid führt durch die unspezifische Oxidation von Proteinen zu generellem oxidativem Stress in der Zelle. Die Induktion der Thioredoxinreduktase ist anscheinend noch von anderen redoxabhängigen Faktoren reguliert, die bei H₂O₂ Stress weniger stark aktiviert werden. Der zeitliche Verlauf der Thioredoxinreduktaseinduktion nach H₂O₂ oder Diamidzugabe verdeutlicht die schnelle Reaktion von *A. fumigatus* auf plötzlich auftretenden oxidativen Stress und die Fähigkeit des Pilzes, ROI effektiv zu detoxifizieren.

2.1.2. Proteomanalyse der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus*.

Um einen Überblick über die ROI induzierte Stressantwort von *A. fumigatus* zu erhalten, wurde der Wildtyp ATCC 46645 über Nacht in AMM/Glucose bei 37 °C vorinkubiert und anschließend 2mM H₂O₂ ausgesetzt. Myzel wurde zum Zeitpunkt T0, T15, T30, T45, T60 und T120 min geerntet und zur Aufreinigung der Proteine Phenol-Ammoniumacetat (siehe Material und Methoden) benutzt.

Die Markierungstechnik mit „2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis“ (DIGE) Farbstoffen ermöglicht die Analyse von zwei Proteinproben und einem internen Standard in einem 2D-Gel. Abbildung 7 zeigt exemplarisch ein 2D DIGE-Gel, in dem Proteinproben von ungestresstem (Cy3/rot) und H₂O₂ gestresstem Wildtypmyzel (Cy5/blau) aufgetrennt wurden. Der interne Standard wurde Cy2 markiert und erscheint in Abbildung 7 gelb. Mit Hilfe der Decyder Software (GE Healthcare) konnten die Veränderungen der relativen Spotvolumina nach Stressinduktion durch 2mM H₂O₂ berechnet werden. Der interne Standard bestand aus einer äquivalenten Mischung der zu vergleichenden Proben und ermöglichte die

Normalisierung der Spotintensitäten mittels „Decyder Software“ (GE Healthcare). Eine Spotvolumenveränderung, die über der zweifachen Standardabweichung lag, wurde als signifikant erachtet. Der Versuch wurde in fünf biologischen mit je vier technischen Replikaten wiederholt, um eine statistisch signifikante Auswertung der Stressantwort von *A. fumigatus* zu ermöglichen.

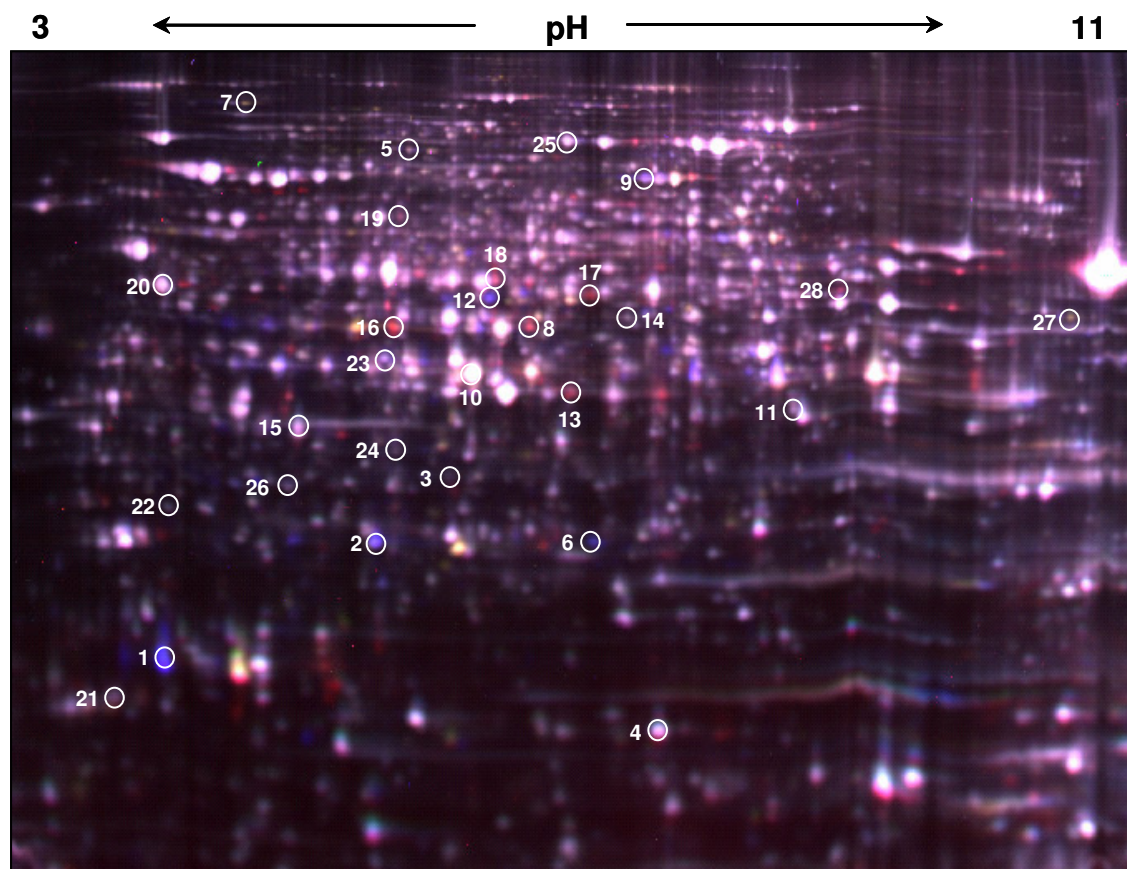


Abbildung 7: 2D DIGE-Gel des H_2O_2 gestressten Wildtyps. Die Proteinprobe des ungestressten Wildtyps wurde Cy3 markiert und erscheint hier rot. Die Proteinprobe nach 45 Minuten Stressinduktion wurde Cy5 markiert und ist blau dargestellt. Der interne Standard setzte sich aus beiden Proben zusammen und wurde Cy2 (gelb) markiert. Der IPG Streifen trennt die Proteine in der ersten Dimension in einem pH Gradienten von 3-11. Spots aus Tabelle 7 sind mit weißen Kreisen markiert und nummeriert.

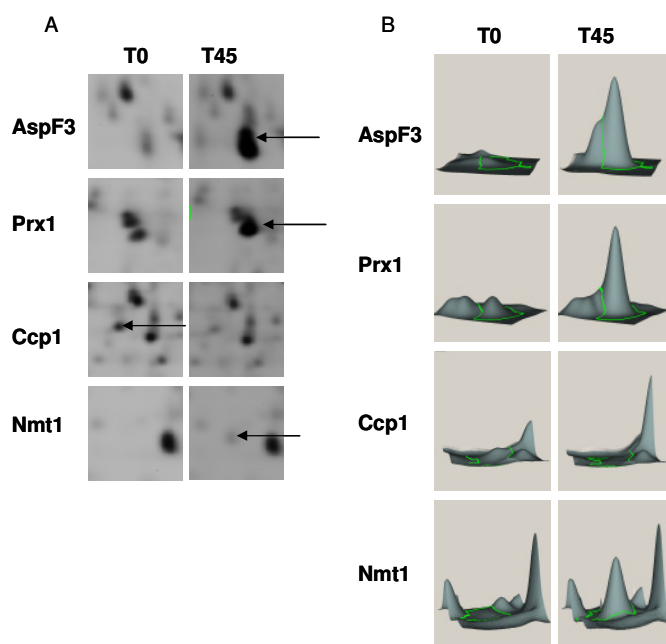
Proteinspots mit veränderten Intensitäten über dem Wert der zweifachen Standardabweichung wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die Proteinidentifizierung erfolgte anschließend über MALDI TOF Analyse. Tabelle 7 stellt die Proteine, die nach H_2O_2 Behandlung veränderte Spotintensitäten zeigten, zusammen.

Tabelle 7 H₂O₂ regulierte Proteine.

Spot	H ₂ O ₂ Regulation		Accession-Nr.	Protein
	15min	45min		
Antioxidative Proteine				
1	+4,3	+10,3	gi 70984685	Allergen Asp F3
2	+2,1	+3,7	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1
3	+2,0	-2,0	gi 70994134	Cytochrom C Peroxidase
4	+2,7	+1,2	gi 70997966	Cu/Zn Superoxiddismutase
5	-	+1,3	gi 70986104	Katalase Cat1
Hitzeschockproteine				
6	+1,8	+2,5	gi 70998901	30 kDa Hitzeschockprotein
Proteasen				
7	+1,2	-2,0	gi 70994510	Zn-abhängige Protease Cym1
Proteintranslation				
8	+1,0	-1,6	gi 70994928	Transl. Initiationsfaktor
Pentosephosphatzyklus				
9	+2,1	+2,1	gi 70995930	Transketolase TktA
10	+2,3	-1,0	gi 70997968	Transaldolase
Glykolyse				
11	+1,9	+2,3	gi 70985278	Glyceraldehyd-3-P-DH
12	+1,7	+3,2	gi 70991192	Pyruvat-DH α Untereinheit
Fettsäure oder Lipidmetabolismus				
13	+1,0	-2,1	gi 70998574	Zn-abhängige Alkohol-DH
14	+1,2	+1,6	gi 70983360	Acetyl Co-A Acetyltransferase
Polyaminweg				
15	+2,9	+1,3	gi 70995928	Spermidinsynthase
Aminosäuremetabolismus				
16	-2,0	-2,0	gi 146323885	Glutaminsynthetase
17	-1,2	-2,2	gi 70998466	Carbamoylphosphatsynthase
18	+1,0	+1,9	gi 70995231	Adenosylhomocysteinase
Zytoskelettaufbau				
19	-3,1	-1,3	gi 70985226	Aktin Interaktionsprotein 2
20	-1,8	+1,1	gi 15625248	β -Tubulin
21	-1,7	-1,5	gi 70987216	Topomyosin
Regulatorische Proteine				
22	+2,2	+1,2	gi 70989229	14-3-3 Fam. Protein ArtA
Kofaktorsynthese				
23	+1,1	+2,0	gi 70985178	Thiaminbiosynthese Protein Nmt1
Purine und Pyrimidinsynthese				
24	+1,2	+3,4	gi 70982225	Phosphoribosyltransferase Xpt1

25	+1,8	+1,4	gi 70983336	Alanyl tRNA Synthetase
				Andere Proteine
26	+2,3	+6,2	gi 70985948	GMC Oxidoreduktase
27	-1,1	-2,1	gi 70982732	Konserv. NAD abh. Dehydrogenase
28	-2,1	-2,3	gi 70982442	UGP1

+/- bezeichnet die Veränderung des relativen Spotvolumens nach 15 bzw. 45 Minuten H_2O_2 Stress im Vergleich zu T0.



Durch die Zugabe von H_2O_2 wurden Proteine induziert, die mit der Detoxifizierung von ROI in direktem Zusammenhang stehen (Thioredoxinperoxidase AspF3, Peroxiredoxin Prx1, Cu/Zn Superoxiddismutase und Katalase Cat1). Gelbildausschnitte sind exemplarisch in Abbildung 8A dargestellt. Die Veränderung der relativen Spotintensität nach H_2O_2 Induktion lässt sich durch die 3D-Ansicht der Decyder Software anschaulich darstellen (Abbildung 8B).

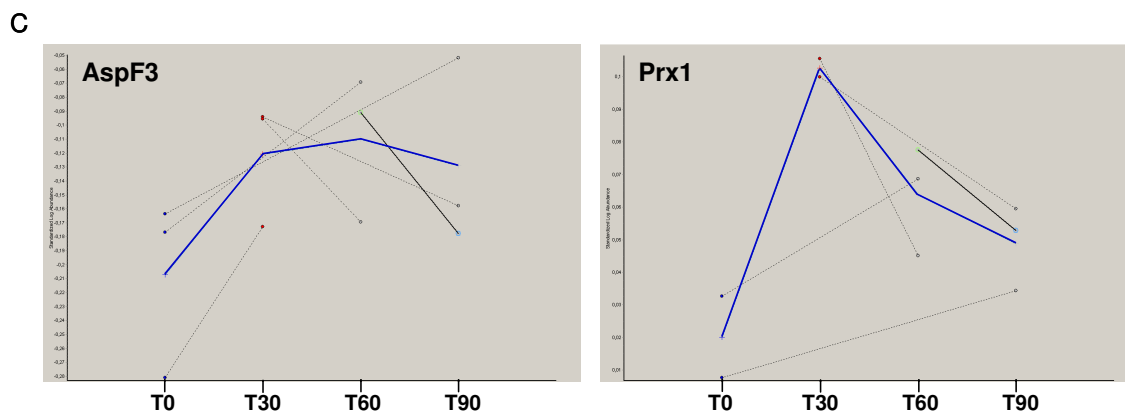


Abbildung 8: Proteinspots nach Induktion mit 2mM H_2O_2 . **A)** Gelbildausschnitte von gestresstem Wildtyp zum Zeitpunkt T0 und T45 min. Spot der Thioredoxinperoxidase AspF3, des Peroxiredoxins Prx1, der Cytochrom C Peroxidase Ccp1 und des Thiaminbiosyntheseproteins Nmt1 sind mit Pfeilen markiert. **B)** Schematische Darstellung der Spots aus A) mit Hilfe der Decyder software. **C)** Zeitverlauf der Spotvolumenveränderung nach H_2O_2 Induktion der Thioredoxinperoxidase AspF3 und des Peroxiredoxins Prx1.

Die Reduktionsäquivalente zum ROI Abbau werden grösstenteils aus der Glykolyse und dem Pentosephosphatzyklus gewonnen. Die Induktion der Glycerinaldehyd 3-Phosphat

Dehydrogenase GpdA nach H_2O_2 Zugabe in *A. fumigatus* deutet auf einen vermehrten Bedarf an NADPH hin.

Auch eine generelle Stressantwort wurde durch 2mM H_2O_2 induziert (30kDa Hitzeschockprotein, Thiaminbiosyntheseprotein Nmt1 und Spermidinsynthase). Hohe Konzentrationen von Peroxid O_2^{2-} (z.B. 2mM H_2O_2) werden in vielen Organismen vornehmlich durch Katalasen und Peroxidasen abgebaut. Bei der Thioredoxinperoxidase AspF3 handelt es sich um eine Thioredoxinabhängige Peroxidase, die in Aspergillosepatienten bereits als Allergen identifiziert wurde. Das Homolog Tsa1p dient in *S. cerevisiae* als Peroxidase, Chaperon und Transkriptionsregulator bei oxidativem Stress. Das Peroxiredoxin Prx1 besitzt ein mitochondriales Signalpeptid und eine Peroxidasedomäne. Es ist anzunehmen, dass beide Proteine H_2O_2 mit Hilfe von Thioredoxin als Kofaktor detoxifizieren.

Mit Hilfe der „biological variation analysis“ (BVA) Software von GE Healthcare wurden die technischen und biologischen Gelreplikate miteinander verglichen. Durch die Verwendung eines internen Standards für alle Gele war es möglich, eine Zeitreihenanalyse durchzuführen. Abbildung 8C zeigt die schematische Darstellung der Spotintensitäten für AspF3 und Prx1 nach 2mM H_2O_2 Stressinduktion im Zeitverlauf. Dabei repräsentieren die grauen Einzelstriche jeweils ein Gel der Versuchsreihe. Die blaue Trendlinie zeigt die von BVA berechnete Spotintensität in Abhängigkeit der Stressinduktionszeit über die gesamte Versuchszeit unter Berücksichtigung der Spotintensitäten in den jeweiligen Einzelgelen. Zur Normalisierung der Daten wurden bei der Zeitverlaufsdarstellung die logarithmierten Werte der Spotintensitäten aufgetragen. Die AspF3 Spotinduktion erfolgt nach Stressinduktion in den ersten 90 Minuten. Anschließend fällt die Spotintensität wieder auf das Ausgangslevel. Der Prx1 Spot hingegen zeigt eine schnelle und sehr hohe Induktion nach 30 Minuten Stressinduktion, die bereits nach 60 Minuten wieder abfällt. Die schnelle Induktion verschiedener Schutzmechanismen nach Zugabe von H_2O_2 legen die Vermutung nahe, dass die Stressantwort durch einige, wenige Regulatoren generell aktiviert wird.

2.2. Charakterisierung des Yap1p Homologen AfYap1 von *A. fumigatus*.

2.2.1. Sequenzvergleich und Homologiesuche von Yap1p in *A. fumigatus*.

Die wichtigsten Proteine zur Detoxifizierung von ROI sind in *S. cerevisiae* durch den Transkriptionsfaktor Yap1p reguliert. Durch Disulfidbrückenbildung innerhalb der Cysteinregion bei oxidativem Stress wird das Kernexportsignal (NES) maskiert und Yap1p akkumuliert im Kern (Kuge *et al.*, 1997, Kuge *et al.*, 2001). Durch „BLAST search“ Analyse in Cadre und NCBI wurde das Yap1p Homologe in *A. fumigatus* identifiziert. Der Locus Afu6g09930 enthält die *Afyap1* Gensequenz. Sie ist 1848bp lang, weist zwei Intronen auf und wird anscheinend zu einem Protein mit 66,7 kDa translatiert. Das Yap1p Homologe gil70992067 in *A. fumigatus* wird im Folgenden AfYap1 genannt.

Abbildung 9 zeigt die Sequenzgegenüberstellung des Yap1p aus *S. cerevisiae* mit AfYap1 aus *A. fumigatus*. Die Sequenzidentität der beiden Proteinsequenzen beträgt 44,7%. Für AfYap1 wird eine Funktion als bZIP Transkriptionsfaktor vorhergesagt. Die DNA Interaktionsdomäne ist in Abbildung 9 blau markiert. Das Kernexportsignal liegt bei AfYap1 zwischen den konservierten Cysteinresten, die zur Regulation der Transkriptionsaktivität und Maskierung des Kernexportsignals bei Stress essentiell sind. Sie sind in Abbildung 9 rot markiert. Um dem identifizierten Yap1p Homologe eine ähnliche Funktion wie in *S. cerevisiae* nachzuweisen, wurden zunächst Kernlokalisationsstudien durchgeführt.

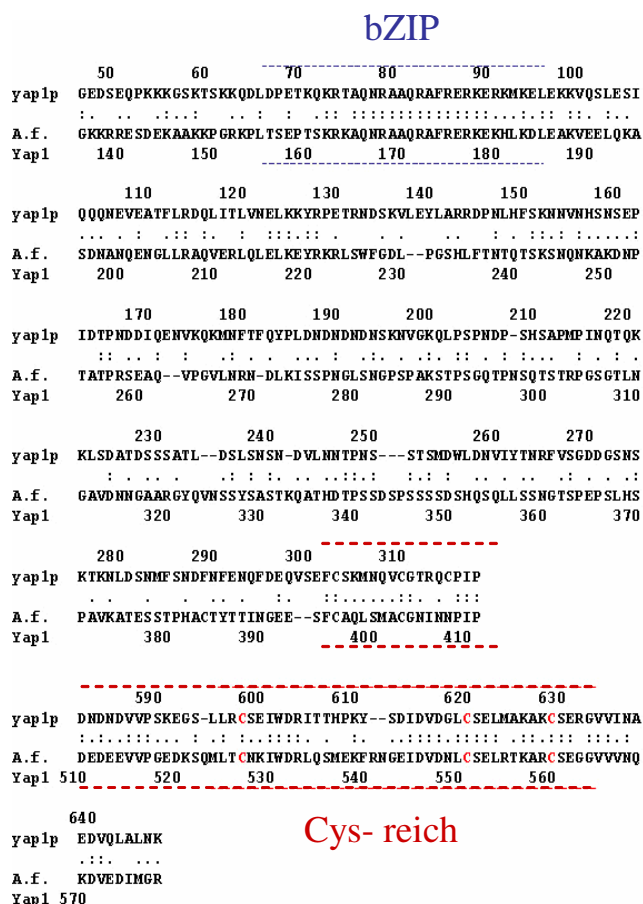


Abbildung 9: Sequenzvergleich von Yap1p mit AfYap1. Gleiche Aminosäuren sind mit einem Doppelpunkt, ähnliche Aminosäuren mit einem Punkt gekennzeichnet. Die bZIP Domäne zur Interaktion mit DNA ist blau markiert, die cysteinreiche Region zur Regulation der Kernlokalisierung rot.

2.2.2. Kernlokalisationsstudien von AfYap1.

Zur Lokalisierung von AfYap1 unter verschiedenen Stressbedingungen wurde aus H_2O_2 gestresstem Wildtypmyzel RNA isoliert, welche als Matrice zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. *Afyap1* wurde mit Hilfe der Primer Yap16/9 und Yap18/10 und einer „Proofreading“ Polymerase amplifiziert und in den Vektor pUCGH (Langfelder *et al.*, 2001) kloniert. Der Vektor trägt das „enhanced“ GFP Gen aus *Aequorea victoria* unter der Kontrolle des *otef* Promotors aus *Ustilago maydis*, der auch in *A. fumigatus* konstitutiv aktiv ist (Spellig *et al.*, 1996). Die schematische Ansicht des Vektors *otef-Afyap1*-eGFP ist in Abbildung 10A dargestellt. Die korrekte Integration des *Afyap1* Gens in pUCGH nach *Bam*HI vermittelter Restriktion wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft (Abbildung 10B). Die erfolgreiche Integration des *otef-Afyap1*-eGFP Konstrukts in das Genom von *A. fumigatus* wurde durch

PCR-Analyse verifiziert (Abbildung 10C). Bei korrekter Integration des Konstruktes ergab sich ein 1,2 kb grosses PCR Produkt. Da der *otef* Promotor konstitutiv aktiv ist, findet in den

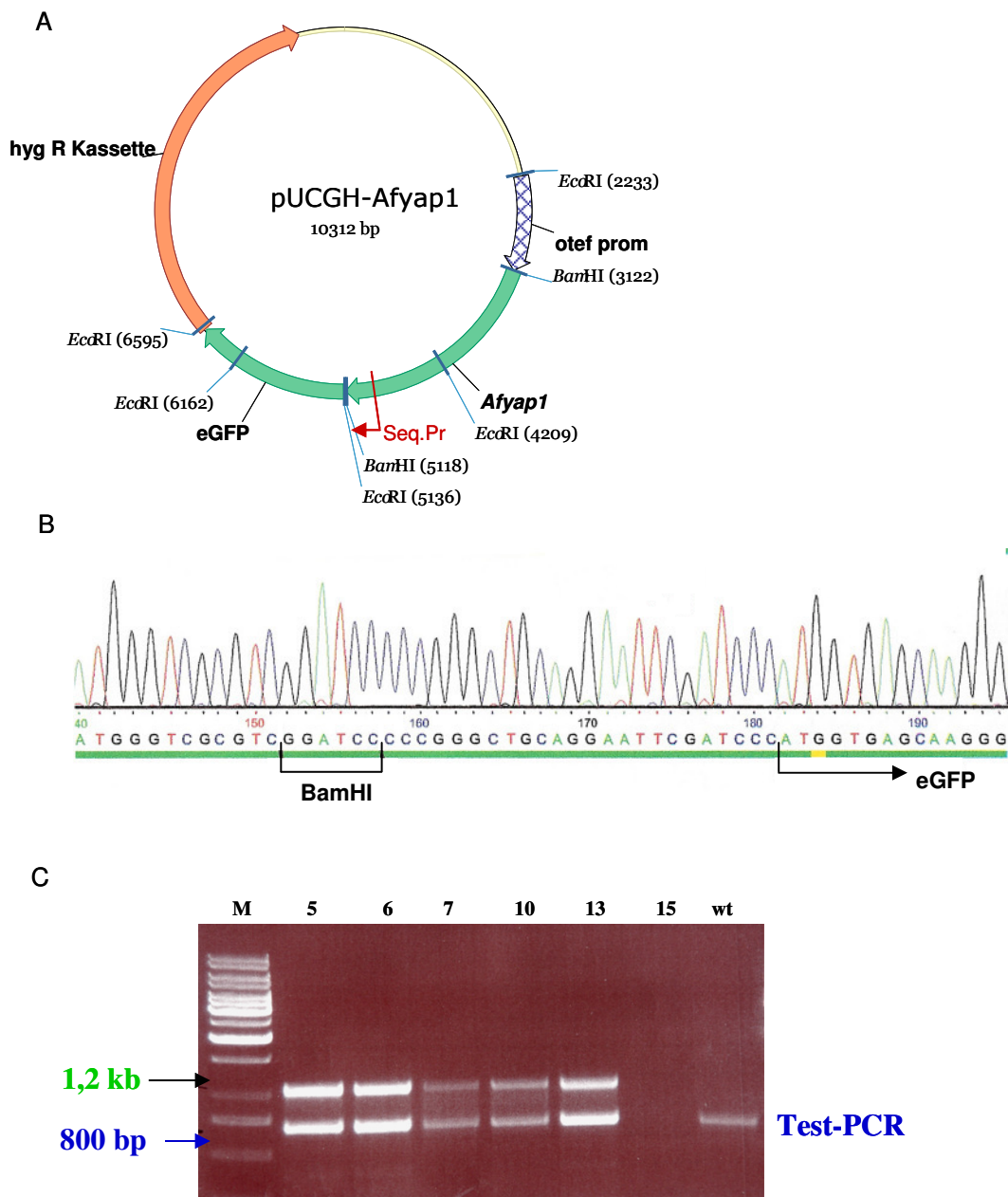


Abbildung 10: **A)** Vektor pUCGH-Afyap1 zur Expression von Afyap1-eGFP unter der Kontrolle des *otef* Promotors. **B)** Die korrekte Integration des *Afyap1* PCR Produkts wurde durch Sequenzierung mit Hilfe des Sequenzierungsprimers Seq.Pr./rot markiert/GTTGTGCCTGGCGAGGAC überprüft. **C)** Integration des *otef*-Afyap1-eGFP Konstruktes in das Genom von *A. fumigatus* wurde mittels PCR nachgewiesen.

den erhaltenen Transformanten eine Überproduktion von AfYap1 statt.

Zur Lokalisierung des AfYap1-eGFP Proteins wurde der erhaltene Stamm ATCC-*otef*-*Afyap1*-eGFP-Hyg^R über Nacht in AMM/Glucose bei 37 °C angezogen und anschließend durch Zugabe von 2mM H₂O₂ gestresst. Bereits 15 Minuten nach Stressinduktion zeigte sich

eine Kernlokalisierung von AfYap1-eGFP (Abbildung 11). Die Kernlokalisierung von AfYap1 wurde durch die Kolo­kalisation mit der DAPI gefärbten DNA im Zellkern der Hyphe verifiziert (Abbildung 11/3). Die Kernakkumulation war reversibel, da das eGFP Signal nach 45 Minuten diffuser wurde, als AfYap1 sich wieder in der Zelle verteilte. Obwohl keine direkte Interaktion zwischen Yap1p und Trx1 (Thioredoxin) in Hefe nachgewiesen wurde, geht man jedoch davon aus, dass Thioredoxin für die Reduktion des Yap1p Proteins verantwortlich ist. Die Theorie stützt sich auf die Tatsache, dass Yap1p in einem $\Delta Trx1$ (Thioredoxinreduktase) Stamm permanent im Kern lokalisiert ist (Izawa *et al.*, 1999).

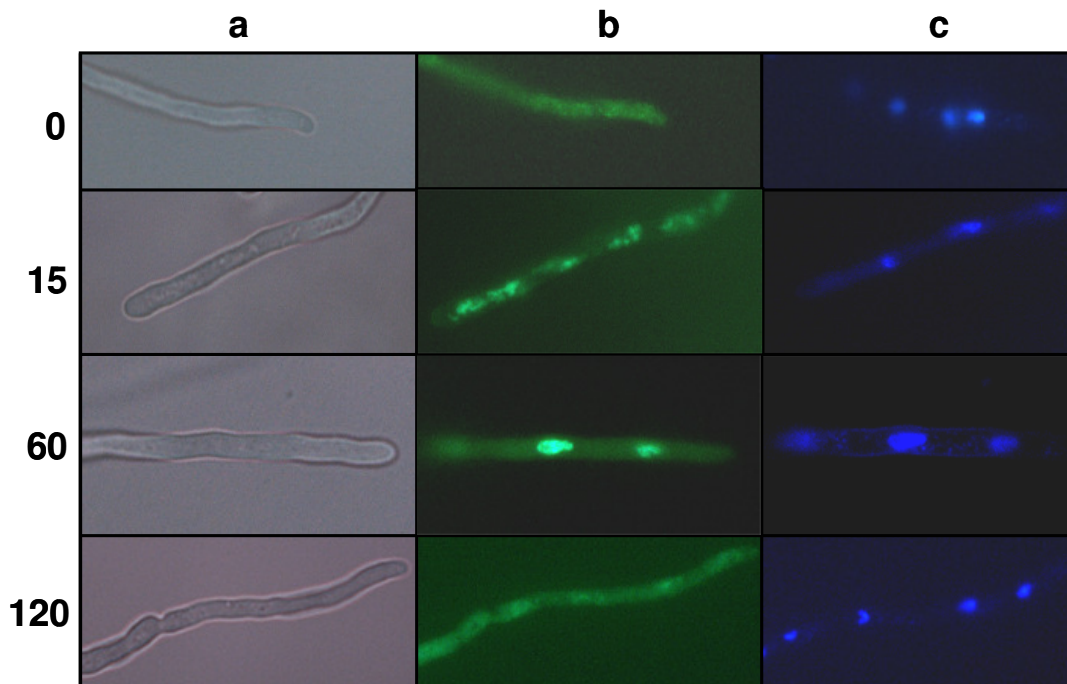


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahme vom Otef-Afyap1-eGFP Stamm nach 0, 15, 60 und 120 Minuten 2mM H₂O₂ Stress.

a) Durchlichtaufnahme **b)** eGFP Filter **c)** DAPI Filter.

Die Kernakkumulation von AfYap1 ist ein hoch dynamischer Prozess, der den oxidativen Zustand der Zelle zeitnah darstellt. Bei einer Behandlung mit 2mM Menadion erfolgte ebenfalls eine schnelle Kernlokalisierung von AfYap1. Das eGFP Signal persistierte allerdings wesentlich länger im Kern als bei H₂O₂ vermitteltem Stress. Auch die Zugabe von 2mM Diamid führte zur Kernlokalisierung von AfYap1. Diamid führt zur Oxidation aller verfügbaren Thiol-Gruppen und damit auch zur Kernlokalisierung von AfYap1. Da Diamid allerdings durch die AfYap1 Zielgene nicht abgebaut wird, war das eGFP Kernsignal beständig (Daten nicht gezeigt) (siehe dazu auch 2.2.5).

2.2.3. Deletion des *Afyap1*-Gens.

Um die Funktion von *Afyap1* in *A. fumigatus* zu untersuchen, wurde ein *Afyap1* Deletionsstamm generiert. Zur Herstellung des Deletionskonstrukts $\Delta Afyap1$ wurden die

flankierenden Bereiche von *Afyap1* mit Hilfe der Primer Yap1, Yap2 (Linke Flanke), Yap3 und Yap4 (rechte Flanke)/Tabelle 5 von genomischer DNA amplifiziert und in pCR2.1TOPO kloniert. Der erhaltene Vektor pCR2.1-rechte-Flanke wurde durch Restriktion mit den Enzymen *XhoI/XbaI* linearisiert und mit der linken Flanke (*XbaI/MluI*) aus pCR2.1-linke-Flanke und der Hygromycinresistenzkassette aus pANsCos1 (*MluI/XhoI*) (Liebmann *et al.*, 2004) ligiert. Der resultierende Vektor TOPO Δ *Afyap1*-Hyg^R trägt die Hygromycin-

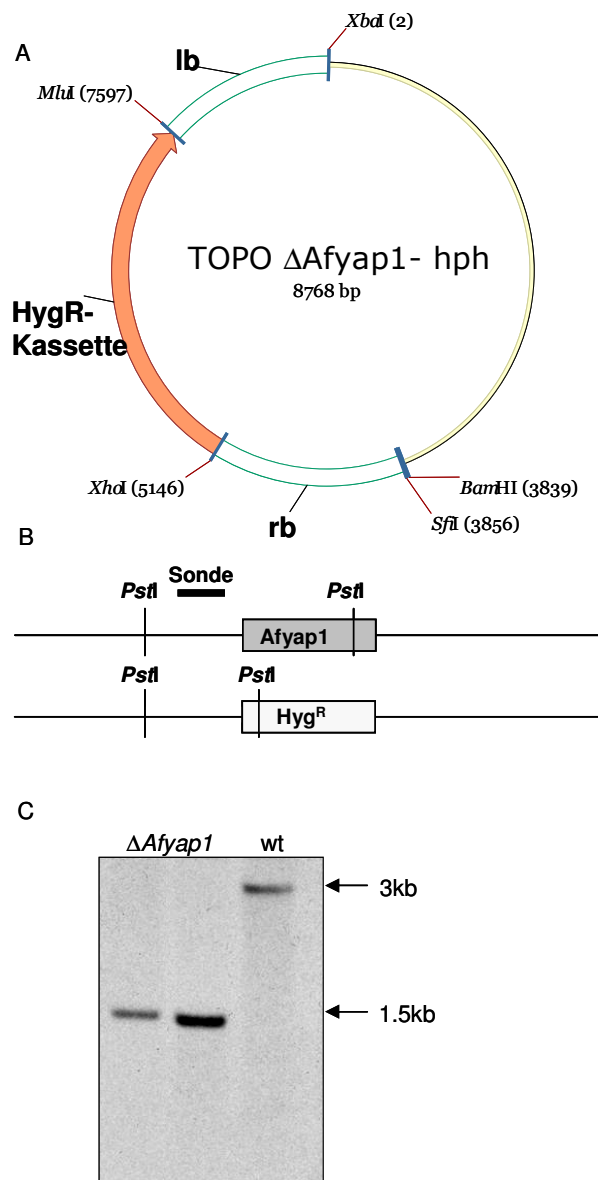


Abbildung 12: Deletion von *Afyap1*.

A) Deletionsplasmid. Flankierende Bereiche des *Afyap1* Gens (lb und rb) zu beiden Seiten der Hygromycinresistenzkassette (Hyg^R).

B) Schematische Darstellung der Integration des Deletionskonstrukts in den *Afyap1* Locus. Die markierte Sonde bindet an der linken Flanke des Deletionskonstrukts. **C)** „Southern blot“-Analyse der Δ *Afyap1* Transformanten und des Wildtyps (wt) nach Verdau der DNA mit *PstI*.

resistenzkassette zwischen den beiden flankierenden Bereichen des *Afyap1*-Gens aus *A. fumigatus* (Abbildung 12A). Hygromycin ist ein Aminoglykosid mit antibakterieller und fungizider Wirkung, das ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde und die Translationsmaschinerie hemmt (Gritz & Davies, 1983). Die Hygromycinresistenz wird durch eine Kinase vermittelt, die Hygromycin phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die Hygromycinresistenzkassette aus pANsCos1 trägt das Resistenzgen *hph* unter der Kontrolle des *gpdA* Promotors aus *A. nidulans*. Bei der Transformation von *A. fumigatus* ATCC 46645 mit dem Deletionskonstrukt aus TOPO Δ *Afyap1*-Hyg^R wurde das *Afyap1* Gen nach homologer Rekombination durch die Hygromycinresistenzkassette ersetzt (Abbildung 12B). Zwei der fünf Transformanten zeigten nach mehrfachen Vereinzelungs-

ausstrichen auf AMM/Hyg-Agar-Platten die erwartete, Gendeletions-spezifische Bande von 1,5kb im „Southern blot“ (Abbildung 12C). Sie wurden zur weiteren Analyse des *Afyap1*-Deletionsstammes benutzt.

2.2.4. Komplementation der *Afyap1* Deletion.

Zur Komplementation der *Afyap1* Deletion wurde das *Afyap1*-Gen mit den Primern Yap10/5 und Yap11/7 aus genomischer DNA amplifiziert. Die an die Primer angehängten Basenpaare ermöglichten den *Bam*HI-Verdau des PCR Produkts und dessen Klonierung in den *Bam*HI linearisierten Vektor pAN8.1 (S. Krappmann, persönl. Mitteilung) (Austin *et al.*, 1990). Der Vektor pAN8.1 trägt die Phleomycinresistenzkassette in einem pUC18 Derivat. Phleomycin ist ein Glycopeptidantibiotikum, das in die DNA interkaliert und so die Struktur der Doppelhelix stört. Das *ble*-Gen der Phleomycinresistenzkassette aus pAN8.1 unterliegt der

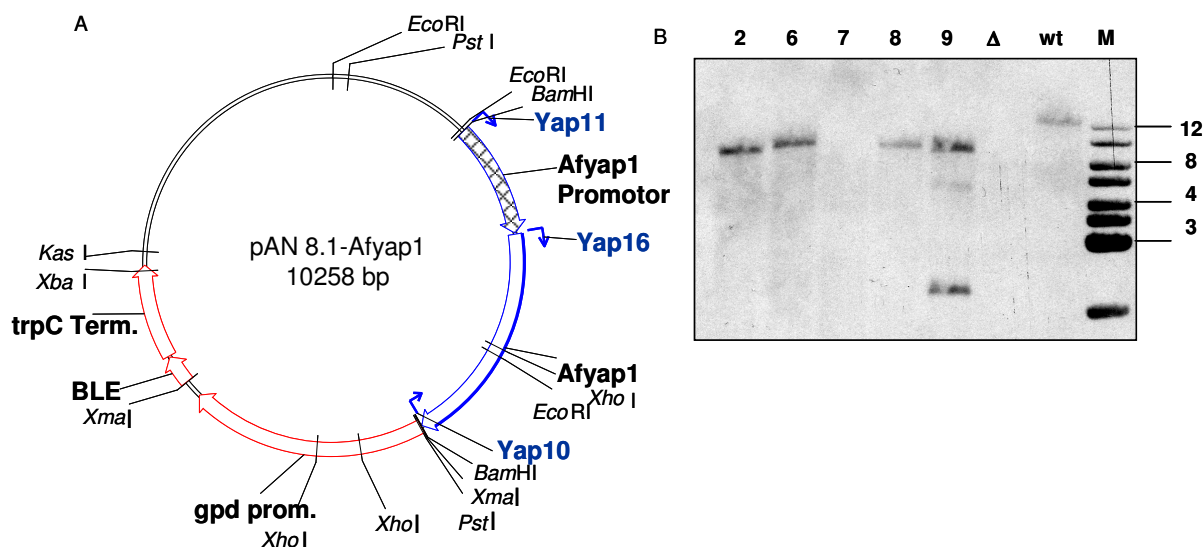


Abbildung 13: Komplementation des Δ *Afyap1* Stammes.

A) Vektor pAN8.1-*Afyap1* trägt das *Afyap1* Gen (blau) unter der Kontrolle des nativen Promotors (kariert) und die Phleomycinresistenzkassette (rot) zur Selektion in *A. fumigatus*. **B)** „Southern blot“ der Komplementations-Transformanten (2, 6, 7, 8). Zur Kontrolle wurde der Δ *Afyap1* Stamm (Δ) und der Wildtyp (wt) mitaufgetragen. Spur 7 zeigt keine Bande, da zu wenig DNA aufgetragen wurde. Spur 9 zeigt neben der erwarteten Bande von etwa 10kb noch eine zusätzliche Bande.

Kontrolle des *gpD* Promotors aus *A. nidulans*, der auch in *A. fumigatus* konstitutiv aktiv ist. Der Vektor zur Komplementation der *Afyap1* Deletion wurde pAN8.1-*Afyap1* genannt und ist in Abbildung 13A schematisch dargestellt. Nach der Transformation des Δ *Afyap1*-Stammes mit dem Komplementationskonstrukt wurden fünf Transformanten im „Southern blot“ analysiert. Als Sonde diente ein internes *Afyap1* PCR Produkt, das mit Hilfe der Primer Yap12/13 und Yap14/14 amplifiziert wurde. Bei drei Transformanten konnte jeweils eine ektopische Integration des Komplementationskonstrukts nachgewiesen werden (Abbildung 13B).

2.2.5. Sensitivität des $\Delta Afyap1$ Stammes gegen ROI.

Da das AfYap1 Homologe in *S. cerevisiae* (Yap1p) für die Regulation ROI detoxifizierender Gene verantwortlich ist und eine *yap1* Deletion zu erhöhter ROI Sensitivität führte, wurde die ROI Sensitivität des $\Delta Afyap1$ *A. fumigatus* Stammes auf Agarplatten bestimmt (Lee *et al.*, 1999, Moye-Rowley, 2003). Der Test basiert auf der Applikation einer toxischen Konzentration der zu testenden Agentien in ein ausgestanztes Loch in der *A. fumigatus* Agarplatte (Lessing *et al.*, 2007). Durch Diffusion des toxischen Stoffes im Agar vom Loch ausgehend Richtung Plattenrand bildet sich ein Konzentrationsgradient des Stoffes, der mit der Diffusionskonstante des Stoffes korreliert. Durch Verwenden der gleichen Volumina an Agar, Konidien und Stressagentien ist der Vergleich der Sensitivität der getesteten *A. fumigatus* Stämme direkt möglich.

Um oxidativen Stress zu erzeugen, wurden jeweils 150 μ L 0,98M H_2O_2 , 1mM Menadion oder 0,1M Diamid im Plattentest eingesetzt. Die Strukturformeln der oxidativen Agentien sind in Abbildung 14 A) schematisch dargestellt. Die Zugabe von H_2O_2 erhöht die Peroxidationkonzentration (O_2^{2-}) im Agar, während die Zugabe von Menadion die Superoxidationkonzentration (O_2^-) erhöht.

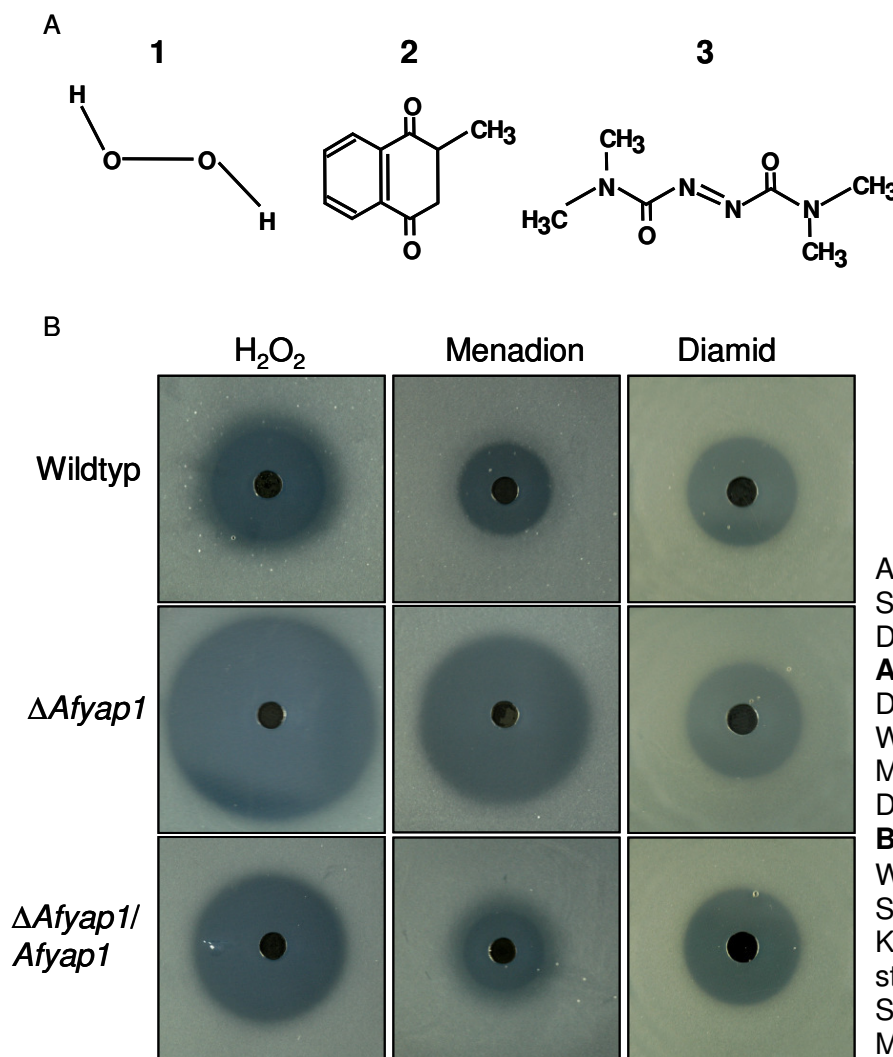


Abbildung 14: ROI Sensitivität der *Afyap1* Deletion.

A) Schematische Darstellung von Wasserstoffperoxid (1), Menadion (2) und Diamid (3).

B) Lochplattentest des Wildtyps, des $\Delta Afyap1$ Stammes und des Komplementationsstammes auf die Sensitivität gegen H_2O_2 , Menadion und Diamid.

Diamid ist ein generelles oxidatives Agens, das alle verfügbaren Thiol-Gruppen in der Zelle oxidiert. Die Oxidation durch Diamid ist unspezifisch und schädigt nicht nur alle Makromoleküle der Zelle, sondern verändert auch ihren Redoxzustand durch Oxidation von Glutathion. Der *Afyap1* Deletionsstamm zeigte eine deutlich erhöhte Sensitivität gegen H_2O_2 und Menadion auf Agarplatte (Abbildung 14B). Die Komplementation der *Afyap1* Deletion führte zu einer Wiederherstellung des Wildtypphänotyps (Abbildung 14B). Die Sensitivität gegen Diamid war nicht durch die *Afyap1* Deletion beeinflusst. Die sehr stark erhöhte Sensitivität des Δ *Afyap1* Stammes gegen H_2O_2 legt die Vermutung nahe, dass AfYap1 die Expression von Peroxidasen oder Katalasen in *A. fumigatus* reguliert. Die Zugabe von 25mM Glutathion in den Plattentest führte zu insgesamt kleineren Hemmhöfen. Die Verkleinerung der Hemmhöfe unter Glutathioneinfluss war bei allen getesteten Stämmen prozentual gleich (Daten nicht gezeigt). Demnach ist sowohl das Thioredoxin- als auch das Glutathion-abhängige Redoxsystem an dem Schutz vor H_2O_2 und Menadion in *A. fumigatus* beteiligt. Die Untersuchung von AfYap1 Zielgenen sollte Aufschluss über die Regulation der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus* geben.

2.2.6. Regulation der Katalaseaktivität durch AfYap1.

Die Regulation der Katalaseaktivität durch Yap1p wurde in *S. cerevisiae* von Lee *et al.* (1999) gezeigt. In *A. fumigatus* wurden bisher drei Katalasen charakterisiert, zwei myzeliale Katalasen Cat1 und Cat2 und die konidienspezifische Katalase CatA (Paris *et al.*, 2003b,

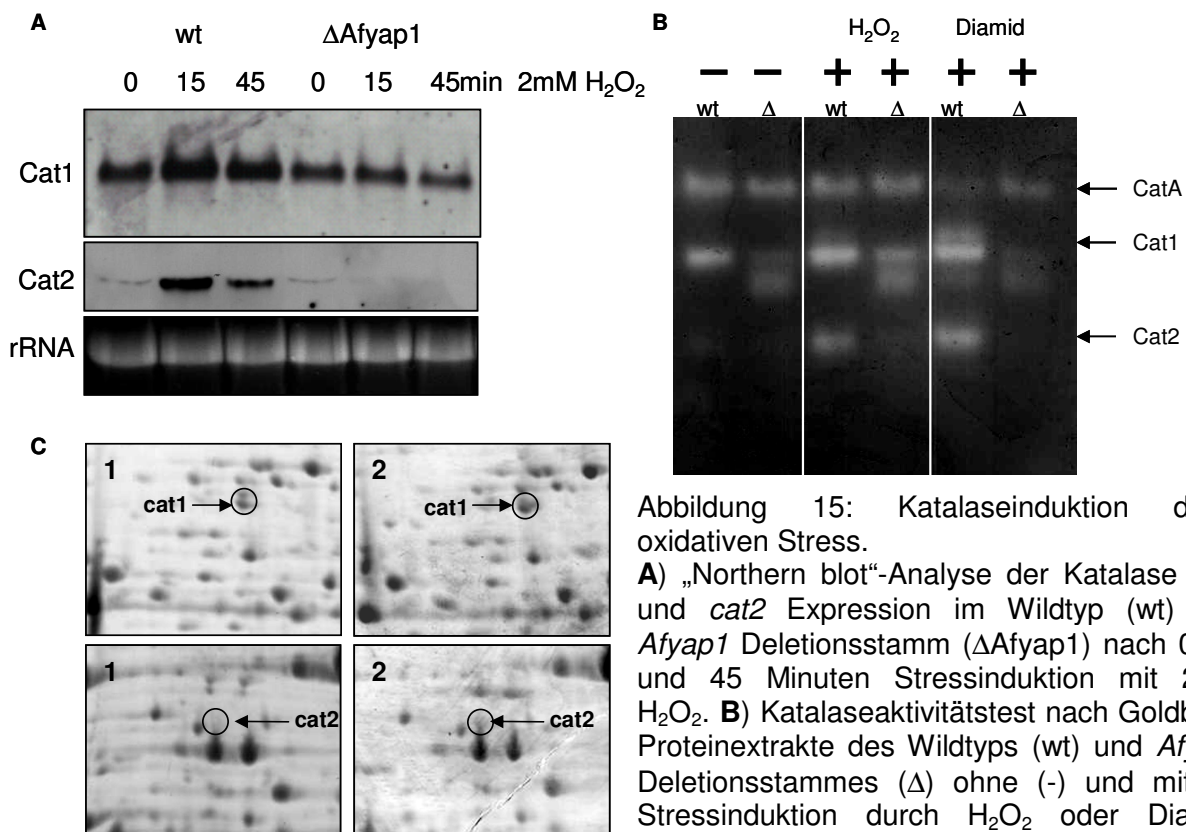


Abbildung 15: Katalaseinduktion durch oxidativen Stress.

A) „Northern blot“-Analyse der Katalase *cat1* und *cat2* Expression im Wildtyp (wt) und *Afyap1* Deletionsstamm (Δ *Afyap1*) nach 0, 15 und 45 Minuten Stressinduktion mit 2mM H_2O_2 . **B)** Katalaseaktivitätstest nach Goldberg. Proteineextrakte des Wildtyps (wt) und *Afyap1* Deletionsstammes (Δ) ohne (-) und mit (+) Stressinduktion durch H_2O_2 oder Diamid. Katalasebanden erscheinen im Gel ungefärbt.

C) 2D-Gelausschnitte der Katalasen Cat1 und Cat2 ohne (1) und mit (2) Stressinduktion durch 2mM H_2O_2 im Wildtyp.

Shibuya *et al.*, 2006). Die Deletion von *catA* in *A. fumigatus* führte zu einer erhöhten Sensitivität gegen ROI, hatte aber keinen Effekt auf die Pathogenität im Mausmodell (Paris *et al.*, 2003b). Die Deletion beider myzelialer Katalasen *cat1* und *cat2* führte zu einer gering erhöhten Sensitivität gegen ROI und einer verzögerten, aber nicht verminderten Virulenz im Mausinfektionsmodell (Paris *et al.*, 2003b).

Die Expression der Katalasen *cat1* und *cat2* im Wildtyp und $\Delta Afyap1$ Stamm wurde im Zeitverlauf nach Induktion durch 2mM H_2O_2 in „Northern blot“-Analysen untersucht (Abbildung 15A). Nach der Vorinkubation in AMM/Glucose über Nacht bei 37°C wurde das Pilzmyzel durch die Zugabe von 2mM H_2O_2 gestresst und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

Der Wildtyp zeigte eine deutliche Induktion der Expression beider Katalasen bereits 15 Minuten nach H_2O_2 Zugabe. 45 Minuten nach Induktion normalisierte sich das Expressionslevel beider Katalasen wieder (Abbildung 15A). Im $\Delta Afyap1$ Deletionsstamm wurde eine konstitutiv schwache *cat1* jedoch keine *cat2* Expression detektiert (Abbildung 15A). AfYap1 reguliert vermutlich die Expression von *cat1* und *cat2*, da beide Transkripte im *Afyap1* Deletionsstamm nicht mehr durch H_2O_2 induzierbar waren.

Die Katalaseaktivität des Wildtyps und des $\Delta Afyap1$ Stammes wurde in nativen Proteinextrakten aus H_2O_2 und Diamid behandeltem Myzel nach Goldberg und Hochmann (1989) bestimmt. Es wurden gleiche Proteinmengen in einem nativen Tris-Glycin Gel aufgetrennt und das Gel wurde anschließend in einer 5mM H_2O_2 Lösung inkubiert. Nach Inkubation des Gels in einer Peroxidaselösung wurde das Gel nach Zugabe von Diaminobenzidin braun gefärbt. An den Stellen, an denen Katalasen das H_2O_2 disproportioniert hatten, blieb das Gel ungefärbt. Entsprechend dem spezifischen Laufverhalten im Gel wurde jeder negativen Bande eine Katalase zugeordnet (Paris *et al.*, 2003b). Der Wildtyp zeigt eine stark induzierte Cat1 und Cat2 Aktivität nach H_2O_2 und Diamidinduktion (Abbildung 15B). Der *Afyap1* Deletionsstamm zeigt keine Induktion der Katalaseaktivität von Cat2 und nur eine geringe Induktion der Katalaseaktivität von Cat1 nach Zugabe von H_2O_2 oder Diamid (Abbildung 15B). Der Deletionsstamm zeigte eine zusätzliche Bande mit Katalaseaktivität, die nicht weiter charakterisiert wurde.

Die Induktion der Katalasen durch H_2O_2 konnte auch in 2D-Gelen nachgewiesen werden. Für den Wildtyp wurden 45 Minuten nach Induktion durch 2mM H_2O_2 erhöhte Proteinspotvolumina (%) für Katalase Cat1 und Cat2 detektiert (Abbildung 15C). Auch im Kulturüberstand konnte eine Induktion beider Katalasen nach H_2O_2 Stressinduktion im Wildtyp nachgewiesen werden. Im Überstand des $\Delta Afyap1$ Stammes wurde keine Katalaseaktivität nach Stressinduktion durch Diamid detektiert (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ist die Expression der Katalase Cat2 in *A. fumigatus* allein durch AfYap1 reguliert. Die Regulation der Expression unter oxidativem Stress ist vermutlich für Cat1 ebenfalls AfYap1 reguliert. Eine konstitutive Cat1 Expression wird offenbar im $\Delta Afyap1$ Stamm durch andere Transkriptionsfaktoren gewährleistet.

2.2.7. Vergleichende 2D-Gele der Stressantwort des Wildtyps und $\Delta Afyap1$ auf H_2O_2 .

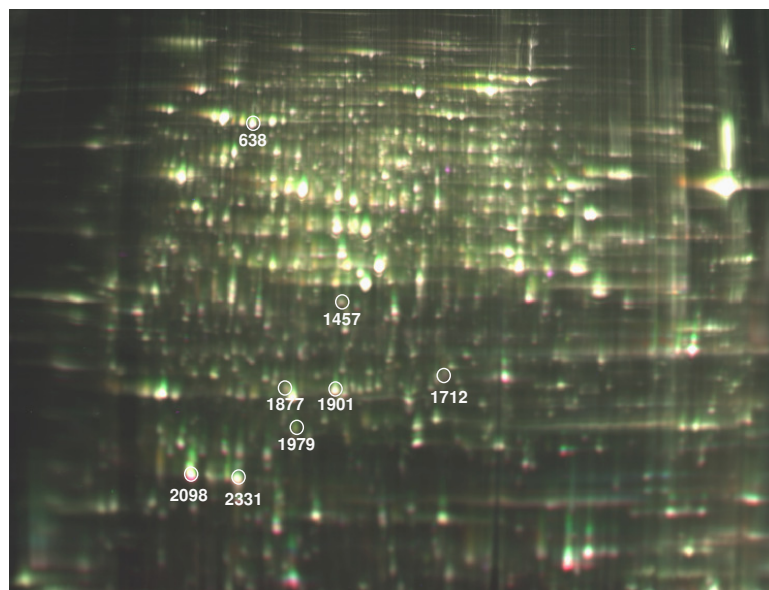


Abbildung 16: 2D DIGE Gel (24cm/pl 3-11) des gestressten Wildtyps (T45/Cy3) versus gestressten *Afyap1* Deletionsstamm (T45/Cy5) und internen Standard (Cy2). Spots aus Tabelle 8 sind weiss markiert.

Yap1p kontrolliert in *S. cerevisiae* die Expression von über 60 Genen zur oxidativen Stressantwort (Godon *et al.*, 1998). Die Proteomanalyse des H_2O_2 gestressten Wildtyps im Vergleich zum gestressten $\Delta Afyap1$ -Stamm sollte den Einfluss von AfYap1 auf die Regulation der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus* aufzeigen. Zur Proteomanalyse wurden beide Stämme in AMM/Glucose über Nacht bei 37 °C angezogen und anschließend mit 2mM H_2O_2 gestresst. Das Mycel wurde nach 45 Minuten Stress-

induktion zur Proteinisolierung geerntet. Der Versuch wurde in drei biologischen sowie jeweils vier technischen Replikaten durchgeführt. Ein 2D-DIGE-Gel ist exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt. Als signifikant galt die Spotregulation, wenn die Veränderung des relativen Spotvolumens oberhalb der zweifachen Standardabweichung lag. Gene von Proteinspots, die aufgrund der *Afyap1* Deletion nicht mehr wie im Wildtyp durch H_2O_2 reguliert wurden, stellen potentielle AfYap1 Zielgene dar. Alle putativen AfYap1 Zielgene sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Proteomanalyse des Wildtyps im Vergleich zum $\Delta Afyap1$ -Stamm nach 45 Minuten 2mM H_2O_2 Stressinduktion.

Spotnummer	Regulation	Accession-Nr.	Protein
Antioxidative Proteine			
2331	-2,01	gi 70984685	Allergen AspF3
1942	-2,81		
2098	+1,51		
2177	+1,47		
1712	+1,99	gi 70983971	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1
1877	+2,33	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1
1901	-2,31	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1
1457	-1,43	gi 70994134	Cytochrom C Peroxidase
309	+1,3	gi 70986104	Katalase Cat1
394	-2,01	gi 70986104	Katalase Cat1
560	-2,02	gi 70983023	Bifunktionale Katalase Cat2

1337	+2,27	gi 70981999	Flavohämoprotein
Hitzeschockproteine			
638	-1,75	gi 70983346	Chaperon HSP- 70 HscA
115	-1,68	gi 70995752	Hsp70 Chaperon Hsp88
2013	-1,29	gi 70998901	30kDa Hitzeschockprotein
1999	-1,67		
1645	-2,17	gi 70991381	Hitzeschockprotein, Klasse I
1731	+1,88		
1793	-2,01		
Transkription/Translation			
202	-2,22	gi 70986914	Elongationsfaktor EF-3
1952	-4,79	gi 70996650	Elongationsfaktor-1 γ
2095	-2,91	gi 70990614	Eukaryot.Initiationsfaktor 5A
1586	-2,02	gi 70993368	Histondemethylase Aof2
Glykolyse/Pyruvatmetabolismus			
1257	+1,27	gi 70985278	Glycerinald. 3-P Dehydr. GpdA
659	+1,6	gi 70999438	Phosphoglukomutase PgmA
845	+1,47		
868	-1,67		
967	+2,36	gi 70991192	Pyruvat Dehydrogenase α UE
965	-1,71		
1168	+2,25		
Pentosephosphatzyklus			
515	-2,04	gi 70995930	Transketolase TktA
595	+1,47	gi 70995930	Transketolase TktA
NADPH Synthese			
1704	+3,68	gi 70990724	Alkoholdehydr.
1239	+1,65	gi 71001436	Mannitol-1-P Dehydrogenase
Proteasen/Proteinabbau			
1274	-1,57	gi 70999520	Aspartische Endopeptidase
2586	-2,46	gi 146322420	Pep2 Ubiquitin UbiA
Purin/Pyrimidinsynthese			
886	-1,51	gi 70985853	GMP Synthase
Aminosäuresynthese			
499	-2,39	gi 70994626	Methioninsynthase
429	-2,16		
1076	-1,82	gi 71001796	Aminotransferase
1135	+1,58	gi 146323885	Glutaminsynthetase
1126	-1,36		
Nicht klassifizierte Proteine			
2134	-2,01	gi 70996869	Hypoth. Protein
734	+1,71	gi 70982442	UGP1
738	-2,11		
736	-2,03		

906	+1,57		
983	-1,84		
1688	-1,54	gi 70985777	Hypoth. Prot.
1979	-2,25	gi 70997834	p-Nitroreduktase Protein
194	-1,79	gi 70993478	PH Domänen Protein
2415	-1,85	gi 71000343	Peptidyl cis trans Isomerase
2504	-1,46	gi 70995183	Hypoth. Prot. GDP-
1023	+2,27	gi 70991609	Mannosepyrophosphorylase
2218	+1,66	gi 70997699	Cofilin
826	+1,55	gi 71000525	Sirohäm synthase
970	-3,03	gi 70986973	Septin AspB

+/- zeigt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität beim Vergleich Wildtyp (2mM H₂O₂) gegen Δ Afyap1 Stamm (2mM H₂O₂) an.

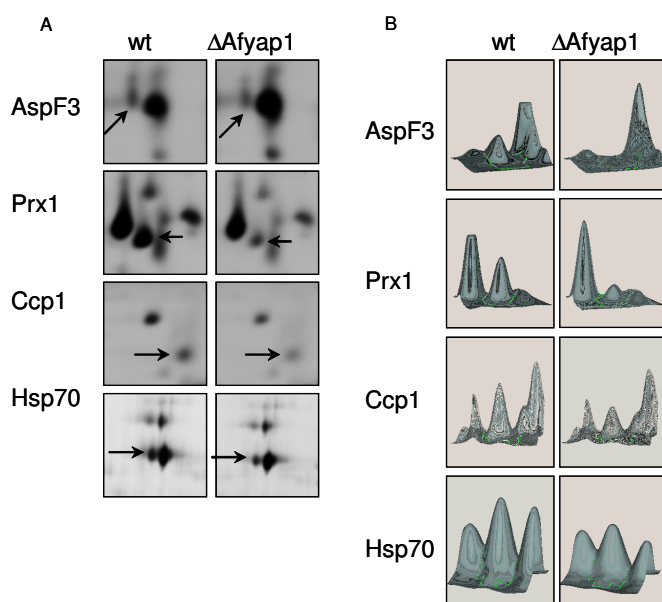


Abbildung 17: Thioredoxinperoxidase (AspF3), Peroxiredoxin (Prx1), Cytochrom C Peroxidase (Ccp1) und Hitzeschockprotein (Hsp70) nach Stressinduktion im Wildtyp und Δ Afyap1 Stamm. A) 2D-Gelbildausschnitte (Spots sind teilweise mit Pfeilen markiert. B) Schematische Spotdarstellung mittels Decyder software.

Die Thioredoxinperoxidase AspF3, die mit Hilfe von Thioredoxin als Kofaktor H₂O₂ detoxifiziert, zeigte AfYap1 abhängige H₂O₂ Induktion (Abbildung 17B und C). AspF3 wurde in Aspergillosepatienten als Allergen nachgewiesen und gilt als Marker von Aspergillusinfektionen (Crameri, 1999). Der Proteinspot der Thioredoxinperoxidase Prx1 zeigte eine starke Verminderung der Spotintensität im *Afyap1* Stamm (Abbildung 17B und C). Die Cytochrom C Peroxidase Ccp1 wies unter H₂O₂ Stressinduktion im Wildtyp eine Reduktion der Spotintensität auf. Im *Afyap1* Deletionsstamm wurde die Spotintensität nach H₂O₂ Stress im Vergleich zum Wildtyp weiter

reduziert. Ccp1 ist in *S. cerevisiae* in den Mitochondrien lokalisiert und dient dort dem Abbau des bei der Atmung entstehenden H₂O₂ (Dabir *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Ccp1 antioxidative Funktionen und Aufgaben in der Signaltransduktion in Mitochondrien inne hat (Jiang & English, 2006). Das Hitzeschockprotein Hsp70 wurde ebenfalls AfYap1 abhängig durch H₂O₂ induziert. Die Chaperonfunktion von Hsp70 in *S. cerevisiae* ist abhängig von der Stressinduktion und den damit verbundenen Interaktionspartnern (Fan *et al.*, 2003). Eine direkte Interaktion zwischen Hsp70 und AfYap1 bei oxidativem Stress ist denkbar. Alle in Abbildung 17 dargestellten Proteine sind bereits in anderen Organismen als

Yap1 reguliert beschrieben worden. Es konnte jedoch auch ein neues AfYap1 Zielgen identifiziert werden, das im Folgenden vorgestellt wird.

2.2.8. Ein neues AfYap1 Zielgen: *pnr1*.

p-Nitroreduktasen katalysieren die Reduktion von NO-Gruppen an Proteinen, indem sie FAD und NADPH als Kofaktor nutzen. Obwohl die biologische Funktion dieser Reaktion noch unklar ist, wird die Rolle der Nitroreduktasen in der Regulation des Redoxzustandes der Zelle diskutiert (de Oliveira *et al.*, 2007).

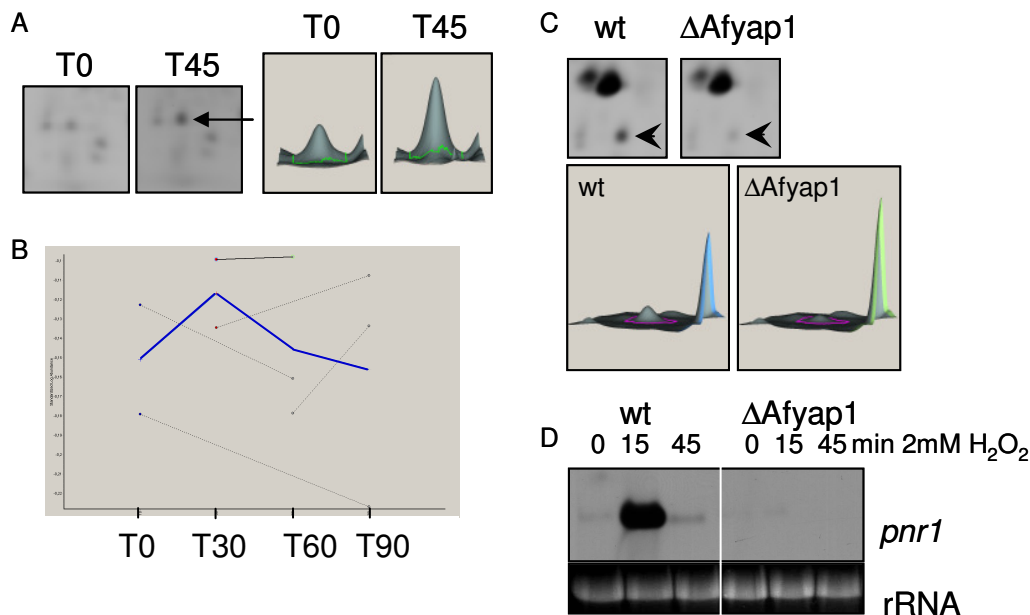


Abbildung 18: p-Nitroreduktase als AfYap1 Zielgen.

A) Erhöhtes relatives Spotvolumen für Pnr1 im Wildtyp nach 45 Minuten Stressinduktion durch 2mM H_2O_2 . **B)** Zeitverlaufsgraphik der Spotvolumenänderung der Pnr1 im gestressten Wildtyp. Die blaue Linie stellt die Trendlinie der Induktion dar. Graue Linien zeigen die Regulation in einzelnen Gelen an. **C)** 2D-Gelausschnitt und schematische Spotdarstellung von Pnr1 beim Vergleich gestresster Wildtyp (wt) gegen gestressten *Afyap1* Deletionsstamm ($\Delta Afyap1$) 45 Minuten nach Zugabe von 2mM H_2O_2 . **D)** „Northern blot“-Analyse der *pnr1* Expression im Wildtyp (wt) und *Afyap1* Deletionsstamm ($\Delta Afyap1$) nach 0, 15 und 45 Minuten Stressinduktion. rRNA-Banden wurden als Ladekontrolle mit abgebildet.

Bisher wurde keine Regulation einer Nitroreduktase durch ein Yap1 Homolog beschrieben. Bei der Stressinduktion des Wildtyps mit 2mM H_2O_2 wurde Pnr1 in 2D-Gelen mit erhöhtem Spotvolumen detektiert (Abbildung 18A). Im H_2O_2 Zeitverlauf zeigte Pnr1 eine kurzzeitig erhöhte Spotintensität 30 Minuten nach H_2O_2 Induktion (Abbildung 18B). Die Deletion von *Afyap1* führte zu einer Reduktion der Spotintensität, die auch nach H_2O_2 Induktion detektiert wurde (Abbildung 18C). Die transkriptionelle Regulation von *pnr1* unter oxidativem Stress und im *Afyap1* Deletionsstamm wurde in „Northern blots“ verifiziert (Abbildung 18D). Im Wildtyp wurde eine deutliche Induktion der Expression nach 15 Minuten H_2O_2 Stress detektiert. Der $\Delta Afyap1$ Stamm zeigte auch nach Stressinduktion keine *pnr1* Expression. Eine

Rolle von Pnr1 in der Regulation des Redoxzustandes der Zelle und bei der Beseitigung von Zellschäden nach oxidativem Stress in *A. fumigatus* ist aufgrund dieser Daten wahrscheinlich. Die alleinige Regulation von *pnr1* durch AfYap1 macht die p-Nitroreduktase zu einem Marker für die AfYap1 Aktivität und oxidativen Stress.

2.2.9. Diamidinduziertes Sekretom von *A. fumigatus* Wildtyp und Δ Afyap1.

Da bei der Infektion von *A. fumigatus* besonders sekretierte Proteine am Schutz des Pilzes vor Immuneffektorzellen beteiligt sein können, wurden stressinduzierte, sekretierte Proteine im 2D-Gel aufgetrennt und analysiert. Zur Untersuchung des Sekretoms von *A. fumigatus* wurden der Wildtyp ATCC 46645 und der Δ Afyap1 Stamm über Nacht in AMM/Glucose bei 37 °C angezogen. Die Induktion von oxidativem Stress erfolgte mit 2mM Diamid. Anschließend wurden die Kulturen weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die sekretierten Proteine in den Kulturüberständen wurden mit Trichloressigsäure gefällt und nach einem Reinigungsschritt mit Aceton in Lysepuffer III /DTT aufgenommen. Wegen der geringen Proteinkonzentration der Proben wurden IPG Streifen (7cm) durch Einquellen der Probe beladen („Rehydration Loading“). Die Auswertung der „colloidal“ Coomassie gefärbten Gele erfolgte mit Hilfe der Delta2D-Software (Decodon). Abbildung 19 zeigt die Auftrennung sekretierter Proteine im 2D-Gel.

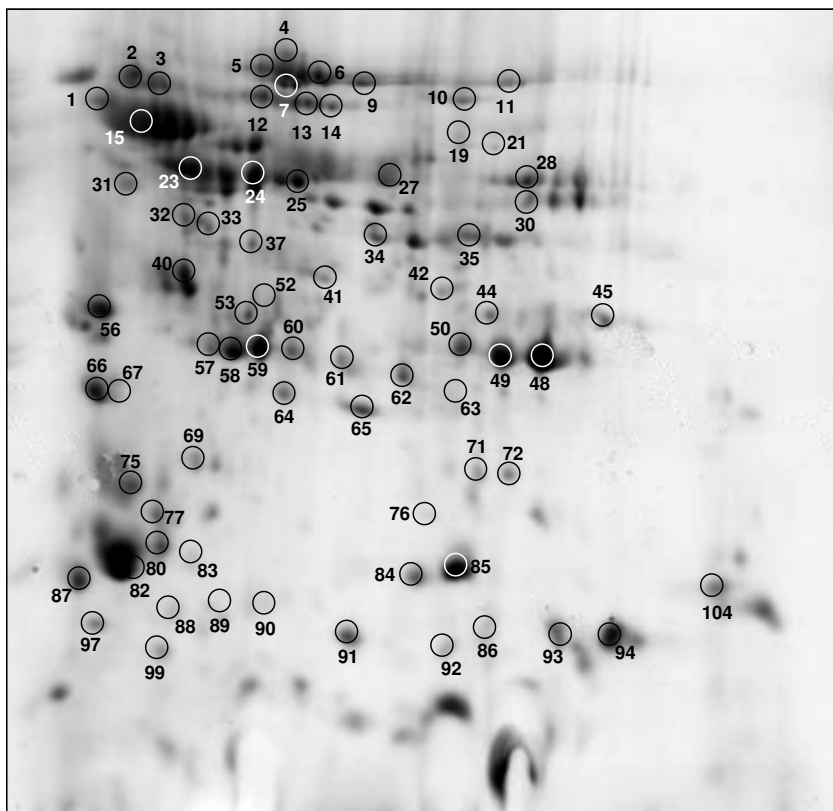


Abbildung 19: Sekretom von *A. fumigatus* nach 24 h Diamid-induktion. Spots aus Tabelle 9 sind schwarz markiert.

Die Regulation der identifizierten Proteine ist in Tabelle 9 dargestellt. Das Sekretom von *A. fumigatus* zeigte insgesamt nur geringfügige Änderungen nach Diamidstressinduktion. Proteinspots, die im Δ Afyap1 Stamm im Vergleich zum Wildtyp weniger Spotvolumen zeigten, sind putative AfYap1 Zielgene. Sie sind in Tabelle 9 fett markiert.

Tabelle 9 Sekretom von *A. fumigatus* nach Diamidinduktion.

Spot	wt ohne vs mit Diamid	Δ Afyap1 vs wt	Accession-Nr.	Protein
Antioxidative Proteine				
12	+1,27	+1,16	gi 2431866	Katalase Cat1
13	+1,85	+1,06	gi 2431866	Katalase Cat1
14	+1,85	+1,14	gi 2431866	Katalase Cat1
7	+1,32	+2,06	gi 2431866	Katalase cat1
10	+2,27	-1,59	gi 70983023	Katalase cat2
71	+1,01	-1,11	gi 70993650	Mn SOD (SodB)
72	+1,12	-1,07	gi 70993650	Mn SOD (SodB)
82	+1,47	+15,8	gi 70993650	Mn SOD (sodB)
84	+1,82	+1,33	gi 17426133	Cu/Zn SOD
85	+1,10	+1,25	gi 17426133	Cu/Zn SOD
77	+1,60	+2,2	gi 70995928	Spermidinsynthase
Proteasen/Proteinabbau/Lyse				
1	-1,13	+1,1	gi 70995317	ribosomales Protein L35
2	+1,53		gi 70994076	Aspart. Endopeptidase AP3
31	+1,44	-1,27	gi 71000273	Proteasom reg. Partikel Rpt1
4	+1,14		gi 2340046	sekretierte Peptidyl-Peptidase
5	+1,01	+1,18	gi 2340046	sekretierte Peptidyl-Peptidase
6	+1,21	+1,13	gi 2340046	sekretierte Peptidyl-Peptidase
48	+1,28	+1,46	gi 70993608	alkaline Serin Protease Alp1
49	+1,08	+1,50	gi 384177	extrazell. alkaline Protease
50	+1,06	+1,50	gi 384177	extrazell. alkaline Protease
15	-1,03		gi 70985761	Aminopeptidase Y
33	+1,74	+1,26	gi 70999544	V Chitinase
56	+1,1	+1,10	gi 70985687	Zellwandglucanase
30	+1,03	+1,57	gi 70996472	α -Glucosidase B
23	+1,06	+1,09	gi 70996140	α -Mannosidase
24	+1,06	+1,39	gi 70996140	α -Mannosidase
32	+1,46	+1,84	gi 70993214	β -N-Acetylhexoaminidase
89	+4,85	-1,19	gi 1220098	Hämolyisin
90	+4,04	+3,17	gi 70997691	Ubi-Cytochrom C Reduktase
91	+2,49	-1,89	gi 1220098	Hämolyisin
92	+2,49		gi 1220098	Hämolyisin
Aminosäuresynthese				
3	-1,27		gi 71000415	Glutaminase A
Glykolyse/Pyruvatm./NADPH				
21	+1,43	-1,07	gi 70999438	Phosphoglukomutase
34	+1,08	-1,09	gi 71001436	Mannitol-1-P-DH
35	+1,76	-1,12	gi 70984134	Formiat DH
45	+2,19	+2,93	gi 70986899	Malat DH
25	+1,14	+1,36	gi 70991443	Enolase
41	-9,58	+9,87	gi 70997968	Transaldolase
28	+4,58	+1,66	gi 70988990	Dihydrolipoamid-DH
64	+1,49	-1,43	gi 70997109	Triose P Isomerase
65	-4,20	+13,21	gi 70997109	Triose P Isomerase
Unklassifizierte Proteine				
11	+1,24	+2,47	gi 70994626	homocyst. S-Methyltransferase

42	-1,19	-1,11	gi 70993334	Guanin-Nukleotid-binde Prot.
61	-1,13	+1,69	gi 70993334	Guanin-Nukleotid-binde Prot.
62	+1,64	+1,154	gi 70993334	Guanin-Nukleotid-binde Prot.
19	+1,11	-1,07	gi 70985948	GMC Oxidoreduktase
26	+1,14		gi 70985799	FAD abh. Oxygenase
27	+1,24	+1,88	gi 70985799	FAD abh. Oxygenase
40	-1,11	-1,98	gi 70994238	Regucalcin
44	+1,08	+8,93	gi 71000943	hypoth. Prot. Afu2g08170
52	+1,15	-1,59	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
53	+1,63	-1,0	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
57	-1,27	-1,19	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
58	+1,42	+1,44	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
59	-1,00	-1,27	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
60	+1,39	-1,03	gi 70990626	Hypoth. Prot. Afu1g04130
63	+1,51		gi 70992943	Säure Dehalogenase
87	-1,07	-2,75	gi 71001828	Allergen AspF13
66	+1,38	+1,19	gi 2879890	rAspF9
67	+1,38	+1,19	gi 2879890	rAspF9
69	+1,74	+38,8	gi 70994880	transl. Initiationsfaktor Gcn20
75	+1,37	-1,4	gi 70985388	Hypoth. Protein
76	-1,69	+1,0	gi 70988980	Peptidyl- cis trans Isomerase
80	+2,59	+2,2	gi 70986268	Zellwandprotein PhiA
83	-1,23	+2,15	gi 70985857	Hypoth. Protein Afu3g01130
86	+1,16	-1,16	gi 71000343	Peptidyl cis trans Isomerase
88	+2,68	+11,77	gi 70983267	Hypoth. Protein Afu8g00430
93	+1,74	+1,52	gi 71000343	Peptidyl cis trans Isomerase
94	+1,27	+1,36	gi 71000343	Peptidyl cis trans Isomerase
97	+3,14	+10,7	gi 85103549	Farnesyl-Synthetase

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität an.

Insgesamt wurde eine relativ hohe Anzahl intrazellulärer Proteine in dem 2D-Gel detektiert, da die lange Inkubationszeit vermutlich zur Degradation älterer Hyphen geführt hat. Interessanterweise wurden auch im Überstand Katalasen Cat1 und Cat2, sowie die Superoxiddismutasen Sod1 und SodB nach Diamidzugabe vermehrt detektiert. Diamid induzierter oxidativer Stress führte zu einem erhöhten Spotvolumen der Endopeptidase AP3 und Chitinase V. Der Zellwandaufbau wurde durch die vermehrte Synthese des Zellwandproteins PhiA und des hypothetischen Proteins Afu1g04130 nach Diamidzugabe modifiziert. Afu1g04130 wurde als „FG-GAP Repeat“ Protein beschrieben und hat hohe Ähnlichkeit zum Integrin aus *Acidobacteria bacterium*. Integrine vermitteln in vielen Organismen die Adhäsion an andere Zellen. Im *Afyap1* Deletionsstamm zeigte sich eine Reduktion des relativen Anteils des Proteins Afu1g04130 im Überstand, wodurch auch das Gen dieses Proteins ein potentielles AfYap1 Zielgen darstellt.

Hämolysin wurde ebenfalls nach Diamidzugabe vermehrt sekretiert. Hämolysine gehören zu den Toxinen, die von *A. fumigatus* während der Infektion sekretiert werden. Ihre Aufgabe besteht in der Lyse humaner Zellen zur Bereitstellung limitierter Nährstoffe wie z.B. Eisen (Malicev *et al.*, 2007). Die *Afyap1* Deletion führte zu einer reduzierten Sekretion von Hämolysin nach Diamidinduktion.

2.2.10. Einfluss von ROI und AfYap1 auf das „Killing“ von *A. fumigatus* durch PMNs.

Um den Einfluss von ROI und der Deletion von *Afyap1* auf die Abtötungsrate von *A. fumigatus* Hyphen durch Granulozyten zu testen, wurden polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (PMN) aus Blutproben gesunder Spender isoliert. Granulozyten stellen etwa 75% der weissen Blutkörperchen und lassen sich in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilen. Das Cytoplasma von Neutrophilen enthält „spezifische“ Granula, die Enzyme wie Lysozym, Kollagenase und Elastase enthalten und „azurophilen“ Granula, die saure Hydrolasen und antimikrobielle Enzyme (Defensine, Myeloperoxidase, Cathelicidine und Lactoferrin) enthalten (Roos *et al.*, 2003). Die neutrophilen Granulozyten in der Lunge stellen neben den Alveolar-Makrophagen und der Aktivität des Flimmerepithels eine der ersten Abwehrmechanismen des Wirts dar, mit denen *A. fumigatus* während der Infektion konfrontiert wird. Neutrophile Granulozyten von Patienten mit defekter NADPH Oxidase (CGD) produzieren nur geringe Mengen ROI (Reistad *et al.*, 2005). In Experimenten kann die NADPH Oxidase durch die Zugabe von Verbindungen wie z.B. Diphenyleneiodonium (DPI) gehemmt werden.

Die PMNs wurden in einem Mischungsverhältnis von 1:1 mit *A. fumigatus* Hyphen gemischt und in RPMI/5%FKS bei 37 °C koinkubiert. Dazu wurden 1×10^6 *A. fumigatus* Konidien in RPMI/5% (v/v) FKS für 8 Stunden bei 37 °C vorinkubiert und die Hyphen durch Zentrifugation geerntet. Nach Isolation der neutrophilen Granulozyten mittels Gradientenzentrifugation wurden 1×10^6 Zellen/mL auf die Hyphen gegeben. Nach Ablauf der Koinkubationszeit wurden die Neutrophilen durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem Wasser lysiert und die Hyphen auf AMM/Glucose Platten ausplattiert. Die Koloniezahlen wurden nach Inkubation der Platten bei 37 °C für 20 Stunden ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Keimungsrate der Ausgangsstämme lässt sich die Überlebensrate der *A. fumigatus* Hyphen in Abhängigkeit der Koinkubationsdauer mit neutrophilen Granulozyten berechnen.

Bereits nach 120 Minuten Koinkubation wurden bis zu 60% der Hyphen des Wildtyps und des $\Delta Afyap1$ Stammes durch die PMNs abgetötet (Abbildung 20A und B). Trotz der erhöhten Sensitivität des $\Delta Afyap1$ Stammes gegen ROI zeigte sich kein Unterschied in der Abtötungsrate durch PMNs im Vergleich zum Wildtypstamm (Abbildung 20B). Die Zugabe von 4mM Glutathion reduzierte den oxidativen Burst und damit den oxidativen Stress der

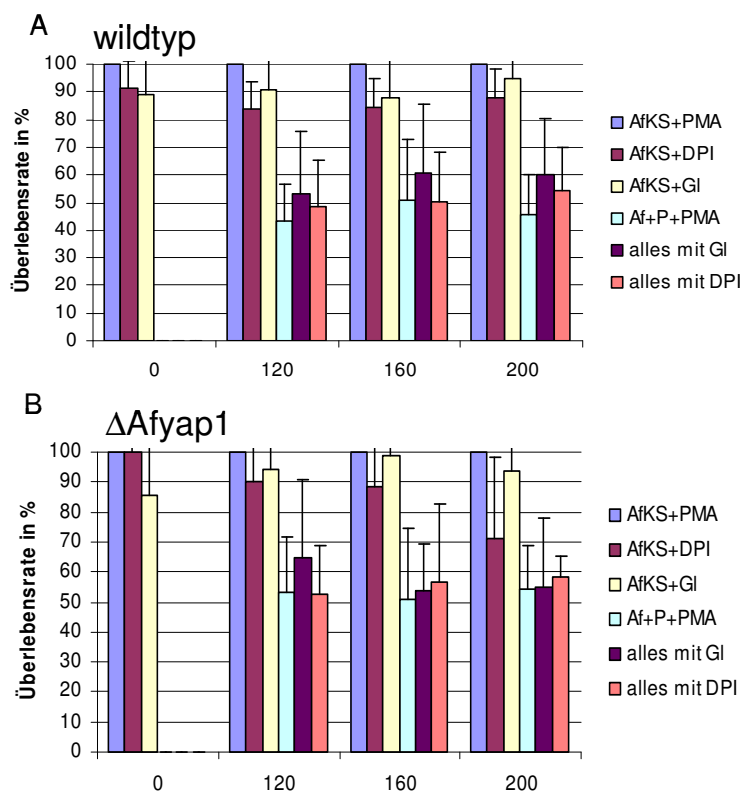


Abbildung 20: Koinkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit PMNs. **A)** Wildtyp und **B)** *Afyap1* Deletionsstamm. Die Zugabe von PMA (hellblau), DPI (dunkelrot) oder Glutathion (gelb) hat keinen Effekt auf das Überleben der Hyphen. Die Überlebensrate der Hyphen nach Inkubation mit PMA und PMNs (hellgrün) wird durch die Zugabe von Glutathion (violett) oder DPI (rosa) nicht beeinflusst.

PMNs auf die Hyphen (Iwona Wozniok, persönliche Mitteilung). Die Zugabe von Glutathion hatte jedoch keinen Einfluss auf das Überleben der Hyphen. Der NADPH Oxidase Inhibitor DPI führte nachweislich zur Inhibierung des „oxidative burst“ durch PMNs, hatte aber ebenfalls keinen Effekt auf das Abtöten von *A. fumigatus* Hyphen (Wozniok *et al.*, 2008). Die Rolle von ROI beim Abtöten von *A. fumigatus* Hyphen durch PMNs ist nach diesen Versuchsergebnissen fraglich.

Da offensichtlich AfYap1 bei der Abwehr von gesunden, neutrophilen Granulozyten durch *A. fumigatus* Hyphen keine bedeutende Rolle zukommt, muss die Infektionsrate des Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp im neutropenischen Mausmodell getestet werden, um die Rolle von *Afyap1* in den frühen Stadien der Infektion zu ergründen.

2.2.11. Mausinfektionen mit $\Delta Afyap1$ -Konidien.

Um eine mögliche Rolle von AfYap1 bei der Infektion von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurden neutropenische Mäuse mit *A. fumigatus* Wildtyp und $\Delta Afyap1$ Konidien intranasal infiziert. Das Infektionsmodell basiert auf einem Minimaldosis-Infektionsmodell von Liebmann *et al.* (2004a).

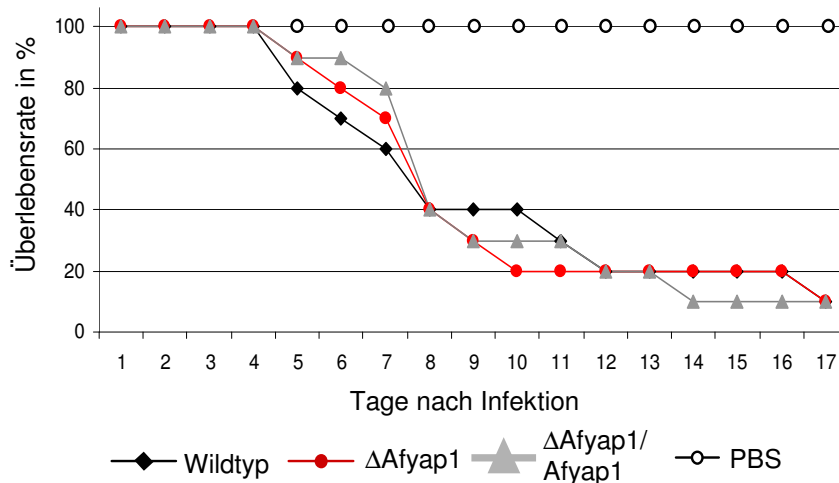


Abbildung 21: Infektion von neutropenischen Mäusen mit Konidien des Wildtyps (schwarz), des *Afyap1* Deletionsstammes (rot) und des $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstammes (grau). PBS Kontrolle (schwarz/weiss).

Die *Afyap1* Deletionsmutante zeigte keine attenuierte Virulenz, wodurch eine Rolle von AfYap1 und dessen Zielgenen in der Infektion neutropenischer Mäuse unwahrscheinlich ist (Abbildung 21). Mäuse, die mit dem $\Delta Afyap1/Afyap1$ Komplementationsstamm infiziert worden waren, wiesen die gleiche Überlebensrate wie der Wildtyp auf. Da in *S. cerevisiae* Yap1 mit Skn7 zur Regulation einiger ROI detoxifizierender Gene interagiert, kann die Bedeutung von ROI in der Infektion von *A. fumigatus* nur durch die Betrachtung beider Transkriptionsfaktoren eindeutig geklärt werden.

3. Charakterisierung von *Afskn7* und der Rolle von AfSkn7 bei der Abwehr von ROI.

Yap1p und Skn7p interagieren in *S. cerevisiae* bei der oxidativen Stressantwort und z.B. bei der Induktion der Thioredoxinreduktase (Lee *et al.*, 1999). Neben der Proteinbindedomäne besitzt Skn7p eine DNA Interaktionsdomäne, mit der das Protein an der Konsensussequenz GGCTGGCC bindet (He & Fassler, 2005). Bindung von Skn7 konnte bereits in den Promotoren der Gene Thioredoxin *Trx2*, Hitzeschockprotein *Ssa1* und der Mannosyltransferase *Och1* in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (Morgan *et al.*, 1997, Raitt *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002). Die Kontrolle der Zellwandsynthese und der meisten Zellzyklusgene, sowie der osmotischen Stressantwort unterliegt in *S. cerevisiae* Skn7p. Da die Interaktion von Skn7p und Yap1p in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, ist es wahrscheinlich, dass auch AfYap1 mit dem Skn7 Homologen in *A. fumigatus* interagiert. Das Skn7 Homologe in *A. fumigatus* konnte durch Sequenzanalysen identifiziert werden. Es wird im Folgenden *Afskn7* (Afu6g12520) genannt. Um die Rolle von AfSkn7 bei der Detoxifizierung von ROI und in der Pathogenität von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurde eine Deletion von *Afskn7* im

Wildtyp und im $\Delta Afskn7$ Stamm vorgenommen.

3.1 Deletion von *Afskn7*

Zur Herstellung des *Afskn7* Deletionskonstrukts wurden die flankierenden Bereiche des Gens per PCR amplifiziert. Hierzu wurden für die linke Flanke die Primer Skn7 ko1 (18) und Skn7 ko2 (19) und für die rechte Flanke die Primer Skn7 ko3 (20) und Skn7 ko4 (21) mit genomischer DNA als Matrize benutzt (Tabelle 5). Die inneren Primer (19 und 20/Tabelle 5) trugen *SfiI* Überhänge, die das spätere Schneiden des PCR-Fragments mit dem Restriktionsenzym *SfiI* ermöglichten. Die PCR Produkte wurden getrennt in den pCR2.1TOPO Vektor kloniert (Invitrogen, Niederlande). Die linke Flanke wurde mit den Restriktionsenzymen *BstXI* und *SfiI* aus dem entstandenen Vektor TOPO-*Afskn7*-LB ausgeschnitten. Die rechte Flanke wurde mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* aus dem Vektor TOPO-*Afskn7*-RB ausgeschnitten. Beide Flanken wurden zusammen mit der Phleomycinresistenzkassette aus pSK341 (*SfiI*) in pCR2.1TOPO kloniert. Der entstandene Vektor TOPO $\Delta Afskn7$ -Phleo wurde durch *SfiI* Verdau und Ligation mit der *PtrA* Kassette aus pSK275 (S. Krappmann, persönl. Mitteilung) auf Pyrithiaminresistenz umklontiert, da die Transformationsselektion mit Phleomycin nicht effizient war. Der Vektor TOPO $\Delta Afskn7$ -*PtrA* diente zur Isolierung des Deletionskonstruktes und ist in Abbildung 22A schematisch dargestellt.

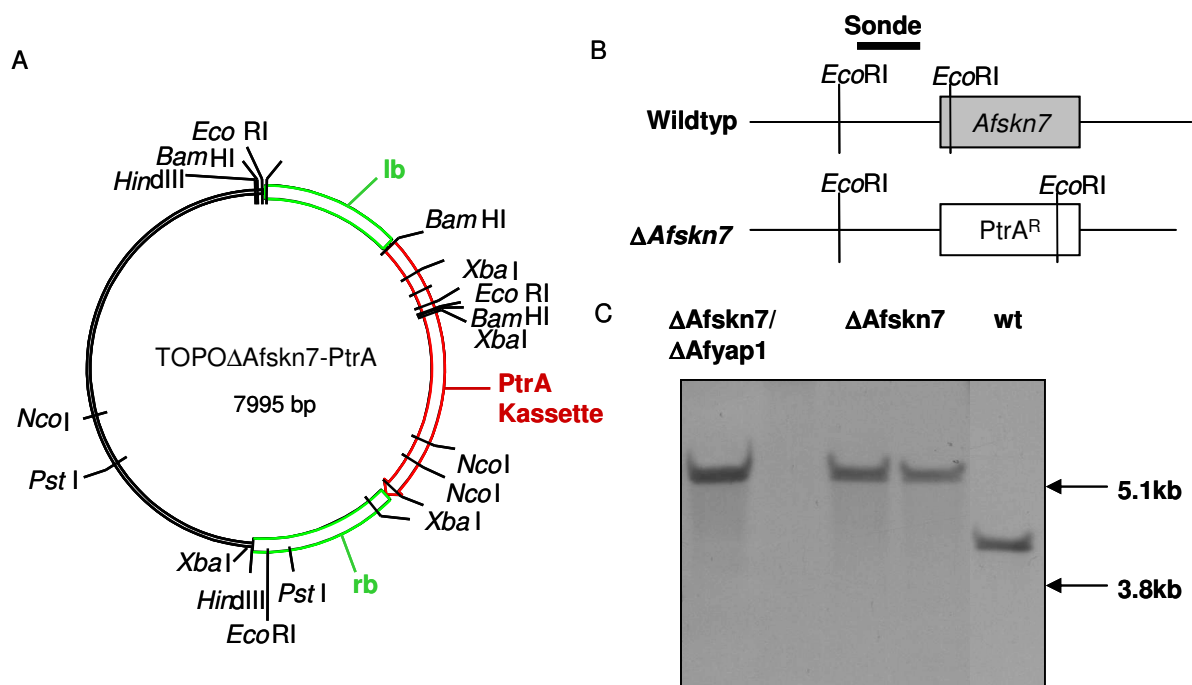


Abbildung 22: Deletion des *Afskn7* Gens.

A) Der Deletionsvektor TOPO $\Delta Afskn7$ -*PtrA* trägt die flankierenden Bereiche des *Afskn7* Gens (grün) und die Pyrithiaminresistenzkassette (rot). **B)** Schematische Darstellung des *Afskn7* Lokus im Wildtyp und bei erfolgreicher *Afskn7* Deletion. **C)** „Southern blot“ von genomischer DNA der $\Delta Afskn7$ Transformanten und des Wildtyps.

Wie bereits bei der Erzeugung des TOPO Δ Afyap1 Vektors beschrieben unterliegt das *ptrA* Gen in der Pyrithiaminkassette aus pSK275 der Kontrolle des *gpdA* Promotors aus *A. nidulans*. Nach Vereinzelung der *A. fumigatus* Transformanten wurde ihre genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und im „Southern blot“ analysiert (Abbildung 22C). Nach erfolgreicher homologer Rekombination des Deletionskonstrukts am *Afskn7* Locus verändert sich das *EcoRI* Restriktionsmuster der DNA bei Hybridisierung mit der linken Flanke als Sonde (Abbildung 22B). Es konnten sowohl ein Δ Afyap1/ Δ Afskn7 Doppeldeletionsstamm, sowie zwei ATCC Δ Afskn7 Deletionsstämme isoliert werden, die nur noch die deletionsspezifische Bande im „Southern blot“ zeigten (Abbildung 22C). Diese Stämme wurden für die Charakterisierung des *Afskn7* Gens benutzt.

3.2 Sensitivität von ATCC Δ Afskn7 und ATCC Δ Afyap1/ Δ Afskn7 gegen ROI.

Zur Charakterisierung der Deletionsstämme (Δ Afyap1, Δ Afskn7, Δ Afyap1/ Δ Afskn7 und Wildtyp) wurde das Wachstumsverhalten auf unterschiedlichen Medien getestet. Es wurden keine Wachstumsunterschiede der Stämme auf 0,01-0,02% (w/v) SDS, 1-2 M Sorbitol, 0,7-1,5 M NaCl oder 50-200 μ M CdCl₂ beobachtet. Des Weiteren konnte kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit bei 28 °C, 37 °C und 48 °C detektiert werden. Auch die Keimungsraten der Konidien unterschieden sich nicht (Daten nicht gezeigt).

Wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben wurde die Sensitivität der Stämme gegen Menadion, H₂O₂ und tBOOH im Agardiffusionstest bestimmt. Da Menadion freie Superoxidanionen O₂⁻ erzeugt, wohingegen H₂O₂ und tBOOH Peroxidation O₂²⁻ erzeugen, ist ein direkter Vergleich der Sensitivität der Stämme gegen unterschiedliche ROI möglich. Abbildung 23 zeigt die Verifizierung der erhöhten Sensitivität des Δ Afyap1-Stammes gegen alle getesteten oxidativen Agentien.

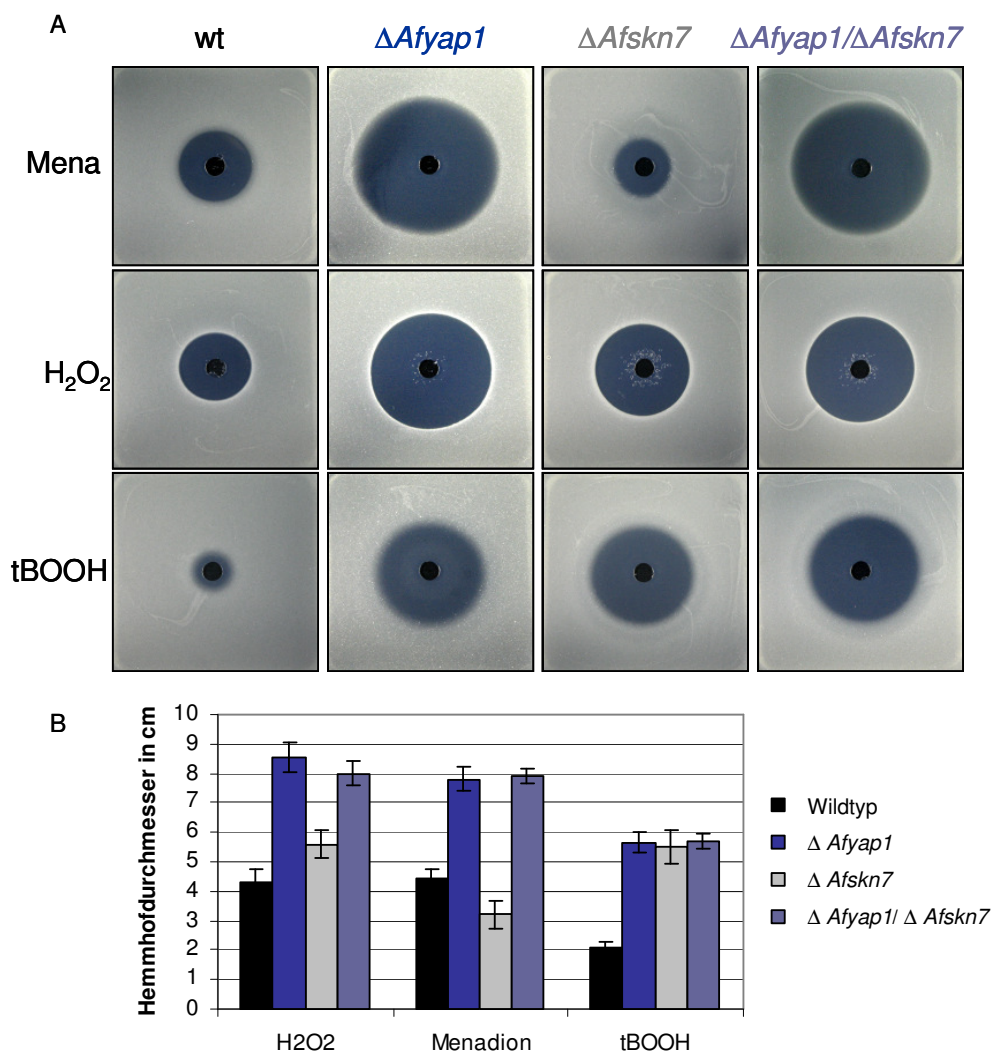


Abbildung 23: Sensitivitätstest des Wildtyps, $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$.

A) Agardiffusionstest gegen H₂O₂, Menadion (Mena) und tBOOH. **B)** Schematische Darstellung der Hemmhofdurchmesser in cm.

Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest ohne Sensitivitätsunterschiede gegen Diamid getestet (Daten nicht gezeigt). Der $\Delta Afskn7$ Stamm zeigte eine erhöhte Sensitivität gegen Peroxidationen (H₂O₂ und tBOOH), aber eine höhere Resistenz gegen Superoxidationen (Menadion) im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 23). Der Doppeldeletionsstamm $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ zeigte eine intermediäre Sensitivität gegen die getesteten ROI, die zwischen der Sensitivität der jeweiligen Einzeldelensionsstämme lag. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch in *A. fumigatus* AfYap1 und AfSkN7 zur Regulation der ROI detoxifizierenden Gene stressabhängig miteinander interagieren. Die Detoxifizierung von Superoxidationen und Peroxidationen geschieht bei oxidativem Stress durch unterschiedliche Enzyme, die vermutlich durch AfYap1 und AfSkN7 reguliert werden. Besonderen Einfluss scheint daher AfSkN7 auf die Regulation der Expression der Gene Superoxidation-abbauender Enzyme zu haben. Promotoranalysen könnten Hinweise auf die Regulation ROI detoxifizierender Gene durch AfYap1 und AfSkN7 geben.

3.3 Promotoranalysen ROI detoxifizierender Gene in *A. fumigatus*.

Die Promotorsequenz liegt meistens am 5'-Ende und somit vor dem RNA-kodierenden Bereich. Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist dessen spezifische Wechselwirkung mit den Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Transkription. In Pilzen beschränkt sich der Promotorbereich meist auf etwa 1500bp vor dem Startcodon des Zielgens. Bei oxidativem Stress bindet Yap1p in *S. cerevisiae* an die Konsensussequenz TTAc/gTAA (Moye-Rowley, 2003). Neuere Studien zeigen, dass Yap1p auch weniger stringent an ähnliche Sequenzen bindet, die das TTA Motiv tragen (Brombacher *et al.*, 2006). In der vorgenommenen Promotoranalyse putativer Zielgene von AfYap1 wurde deshalb ein Basenaustausch („mismatch“) in der Konsensussequenz toleriert. Skn7p bindet in *S. cerevisiae* an der Konsensussequenz GGCTGGCC (He & Fassler, 2005). Die DNA Bindung ist auch bei Skn7 nicht hoch spezifisch, sondern erlaubt den Basenaustausch zu der Sequenz GGCCGG oder GGC(c/t)GGC (Tsuzi *et al.*, 2004). Die Promotoren der wichtigsten ROI Detoxifizierungsgene wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI nach putativen AfYap1 und AfSkn7 Bindestellen untersucht. Tabelle 10 zeigt die wichtigsten putativen ROI Detoxifizierungsgene aus *A. fumigatus* und ihre putativen AfYap1 bzw. AfSkn7 Bindestellen.

Tabelle 10 Promotoranalyse ROI detoxifizierender Gene.

Gen	Kürzel	Accession-Nr.	AfYap1-		AfSkn7-	
			Position	Binde- sequenz	Position	Binde- sequenz
Afyap1	<i>Afyap1</i>	Afu6g09930	-1211 -1327	TTAgTAAcTAA TTAgTAA	-865	GaCTGGCC
Afskn7	<i>Afskn7</i>	Afu6g12520			-322	GGgTCCC
Thioredoxinreduktase	<i>trr1</i>	Afu4g12990	-884	TTAggTAA	-651	GaCTGGCC
Thioredoxinperoxidase	<i>aspF3</i>	Afu6g02280	-687	TTcgTAA		
Thioredoxinperoxidase	<i>prx1</i>	Afu4g09110	-685	TTAaTAA		
		Afu8g07130	-603	TTAtgTAA		
Glutathion	<i>gsh2</i>	Afu5g06610	-131	TTAaTAA		
Glutathionreduktase	<i>glr1</i>	Afu1g15960				
Glutathionperoxidase	<i>gpx3</i>	Afu3g12270			-1184	GGCTcGCC
					-863	GGCTGGCC
					-300	GGCTGGgC
Cytochr. C Peroxidase	<i>ccp1</i>	Afu6g13570			-1162	GGCTGGCC
Peroxidase		Afu5g02300			-952	GGCTcGCC
Katalase 1	<i>cat1</i>	Afu3g02270				
Katalase 2	<i>cat2</i>	Afu8g01670	-140	TTAtTAA	-241	GGCTGGaC
			-605	TTAggTAA	-1200	tGCTGGCC
Katalase A	<i>catA</i>	Afu6g03890	-950	TTAtTAA	-1300	aGCTGGCC

Gen	Kürzel	Accession-Nr.	Pos.	YRE	Pos.	Afskn7 Bindest.
Katalase C	<i>catC</i>	Afu2g18030	-500	TTActTAA	-384	GGCTGcCC
					-165	GGCTGGtC
Spermidinsynthase	<i>sps1</i>				-254	GGCTGaCC
Cu Superoxiddismutase	<i>sod1</i>	Afu5g09240				
Cu/Zn Superoxiddismutase	<i>Cu/Zn sod</i>	Afu1g11640			-53	GGCTGtCC
Mn Superoxiddismutase	<i>Mn sod</i>	Afu1g14550			-607	GaCTGGCC
Fe Superoxiddismutase	<i>Fe sod</i>	Afu6g07210			-54	aGCTGGCC
Superoxiddismutase B	<i>sodB</i>	Afu4g11580				
Transketolase	<i>tktA</i>	Afu1g13500	-982	TTAtTAA	-214	GGCTGtCC
Pyruvat Dehydr. α UE		Afu1g06960	-324	TTAagTAA	-1209	GGgTGGCC
Alkohol Dehydr.	<i>adhx</i>	Afu5g06240			-1064	GGCaGGCC
					-234	GaCTGGCC
Glycerinaldehyd-3-P-DH	<i>gpdA</i>	Afu5g01970	-1322	TTAagTAA	-881	GGCTGtCC
					-584	GGCTGGaC
Alanyl tRNA Synth.		Afu8g03880	-937	TTAgTAA		
			-911	TTAgaTAA		
			-1300	TTAaTAA		
Thiaminbiosynthese	<i>nmt1</i>	Afu5g02470				
Hsp70 Chaperon	<i>hscA</i>	Afu8g03930	-510	TTAtTAag		
			-380	TTAagTAc		
Spermidinsynthase		Afu1g13490	-526	TTtaTAA		
			-1016	TTcgATAA		
p-Nitroreduktase	<i>pnr1</i>	Afu5g09910	-1020	TTAaTcA	-1260	GGCCaCtC
			-1127	TTAgTAA		
			-1164	TTAcTAA		
			-1208	TTAaTAA		

Die Positionswerte sind in Basenpaaren vor dem „Startcodon“ des Zielgens angegeben. Basenpaare in der Bindesequenz, die der Konsensussequenz des Transkriptionsfaktors entsprechen, sind in Grossbuchstaben geschrieben.

In den Promotoren der Transkriptionsfaktoren AfYap1 und AfSkn7 wurden jeweils Bindestellen für eine Autoregulation gefunden. Im Promotor von *Afyap1* konnte auch eine AfSkn7 Bindestelle identifiziert werden. Im Promotor der Thioredoxinreduktase befinden sich sowohl AfYap1 als auch AfSkn7 Bindestellen, was eine Regulation durch beide Transkriptionsfaktoren vermuten lässt. In den Promotorsequenzen beider Thioredoxinperoxidasen Pxr1 und AspF3 (Tsa1) wurden mehrere putative AfYap1 Bindestellen identifiziert. Der Promotor des Glutathionperoxidasegens Gpx3 wies keine AfYap1 Bindestelle sondern mehrere AfSkn7 Bindestellen auf. Gpx3 ist bei der Regulation der Kernlokalisation von Yap1 in *S. cerevisiae* beteiligt. Eine Regulation der *gpx3* Expression durch AfSkn7 in *A. fumigatus* gibt einen Hinweis auf den „cross talk“ zwischen den beiden

Transkriptionsfaktoren. In den Promotoren der Katalasen *cat2* und *catA* wurden sowohl AfYap1 als auch AfSkn7 Bindestellen identifiziert. Die Katalase *cat1* zeigte im „Northern blot“ eine Deregulation der Expression nach Deletion von *Afyap1* (Abbildung 15), obwohl ihr Promotor keine putativen AfYap1 Bindestellen aufwies (Tabelle 10). Das p-Nitroreduktasegen wurde bereits als neues AfYap1 Zielgen beschrieben. In ihrem Promotor wurden mehrere AfYap1 Bindestellen und eine AfSkn7 Bindestelle identifiziert, was die Regulation der *pnr1* Expression durch AfYap1 bestätigt. Zusammenfassend wurden AfYap1 Bindestellen in Promotoren der Thioredoxin abhängigen Detoxifizierungsgene und der Katalasen identifiziert. AfSkn7 Bindestellen wurden dagegen öfter in Promotoren von Genen der Glutathion-abhängigen ROI Detoxifizierungsmechanismen und der Superoxiddismutasen detektiert. Promotorsequenzanalysen geben jedoch nur Hinweise auf eine mögliche Regulation der Expression durch den untersuchten Transkriptionsfaktor.

3.4 „Northern blot“-Analyse ROI detoxifizierender Gene.

Um die Regulation ROI detoxifizierender Gene durch die Transkriptionsfaktoren AfYap1 und AfSkn7 zu untersuchen, wurden Übernachtskulturen des *A. fumigatus* Wildtypstammes, Δ Afyap1-Stammes, Δ Afskn7-Stammes und Δ Afyap1/ Δ Afskn7-Stammes mit 2mM H₂O₂ oder 2mM Menadion inkubiert. RNA wurde zu den Zeitpunkten T0, T15 und T45 Minuten aus den Proben isoliert. Exemplarisch für die oxidative Stressantwort wurden die „Northern blots“ mit Sonden auf zwei Superoxidanionen (O₂⁻)-detoxifizierende Gene (Superoxiddismutase *sod1* und *sodB*) und zwei Peroxidanionen (O₂²⁻)-detoxifizierende Gene (Katalase *cat1* und Thioredoxinperoxidase *aspF3*) beprobt (Abbildung 24A und B).

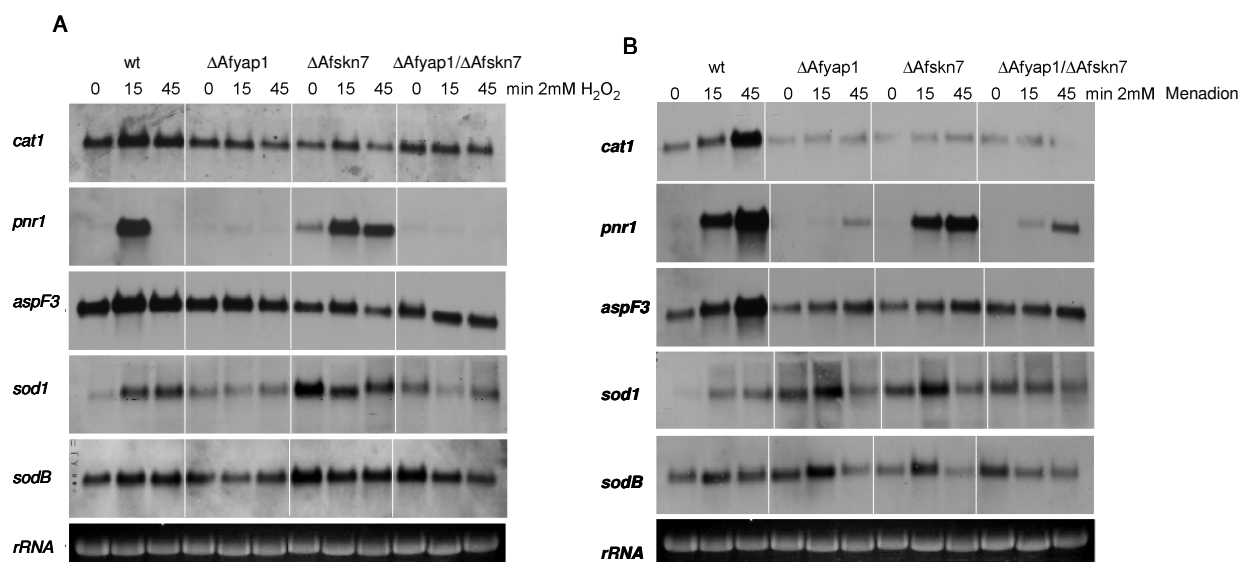


Abbildung 24: „Northern blot“-Analyse des Wildtyps (wt), des *Afyap1* Deletionsstammes (Δ Afyap1), des *Afskn7* Deletionsstammes (Δ Afskn7) und des Doppeldeletionsstammes (Δ Afyap1/ Δ Afskn7) für die Expression der Katalase (*cat1*), die p-Nitroreduktase (*pnr1*), der Thioredoxinperoxidase (*aspF3*) und der Superoxiddismutasen *sod1* und *sodB* unter A) H₂O₂ - oder B) Menadioninduktion. Die rRNA diente als Ladekontrolle des Blots.

Als Kontrolle diente eine Sonde auf die p-Nitroreduktase *pnr1*, die bereits in Kapitel 2.2.8 als AfYap1 Zielgen beschrieben wurde. Abbildung 24A zeigt die H₂O₂ abhängige Induktion des p-Nitroreduktasegens im Wildtyp und im Δ *Afskn7* Stamm. Die Deletion von *Afyap1* führte zum Ausfall der *pnr1* Expression.

Im „Northern blot“ wurde eine schnelle Induktion der Katalase *cat1* und der Thioredoxinperoxidase *aspF3* durch Zugabe von H₂O₂ im Wildtyp detektiert (Abbildung 24A). Die H₂O₂ abhängige Induktion der Expression von *cat1* und *aspF3* wurde durch die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* gestört. Der Δ *Afskn7* Stamm zeigte eine schwache Induktion der *cat1* und *aspF3* Expression nach 15 Minuten Inkubation mit H₂O₂. Die Deletion von *Afyap1* führte zu einer stressunabhängigen, konstitutiven Expression beider Gene (Abbildung 24A). Die Expression beider Superoxiddismutasen wurde im Wildtyp durch H₂O₂ nach 15 Minuten leicht induziert. In der Δ *Afyap1*-Mutante war keine Induktion dieser Gene detektierbar. Eine *Afskn7* Deletion führte zur konstitutiv hohen Expression beider Superoxiddismutasen, die durch die Zugabe von H₂O₂ nach 15 Minuten Stressinduktion reprimiert wurde (Abbildung 24A).

Die Zugabe von Menadion induzierte die Expression von *cat1*, *aspF3* und *pnr1* maximal nach 45 Minuten (Abbildung 24B). Die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* führte zu einer nicht mehr induzierbaren, permanenten Expression von *cat1*. *AspF3* zeigte auch in den Deletionsstämmen eine leichte menadionabhängige Induktion (Abbildung 24B). Die Basalexpression von *aspF3* war in den Deletionsstämmen stark reduziert.

Beide Superoxiddismutasegene zeigten im Wildtyp eine leichte Induktion der Expression 15 Minuten nach Menadionzugabe. Dieser Effekt wurde durch die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* verstärkt. Es wurde dementsprechend nach Menadioninduktion mehr Transkript der Superoxiddismutasegene in den Deletionsstämmen als im Wildtyp detektiert. Bei der Doppeldeletion von *Afyap1* und *Afskn7* wurde keine Induktion der Expression nach Menadioninduktion mehr detektiert. Daher sind beide Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt.

3.5 Sensitivitätstest gegen „Congo Red“, Amphotericin B und Imidazol.

Wegen der unterschiedlichen Sensitivität der Deletionsstämmen gegen Superoxidanionen- und Peroxidanionen-generierende Agentien, wurden die Stämme auf ihre Sensitivität gegen unterschiedliche Fungizide getestet, die u.a. mit der Stressantwort der Zelle korrelieren.

„Congo Red“ wird zum Anfärben pilzlicher Zellwände genutzt. Es bindet an β -1,3 Glucan der pilzlichen Zellwand und verändert die Zellwandstruktur. Mit „Congo Red“ behandelte Hefezellen zeigen Teilungsdefekte und bilden fehlerhafte Septen (Ram & Klis, 2006). Amphotericin B, Imidazol und Caspofungin werden in der Klinik zur Behandlung von Aspergillosen eingesetzt. Amphotericin B bindet an Ergosterol der Cytoplasmamembran des Pilzes und zerstört die osmotische Integrität der Membran. An der Membran werden auf bisher ungeklärte Weise Magnesium und Kalziumionen gebunden, wodurch es zum Ausfall

vieler oxidativer Enzyme auf der Zelloberfläche kommt. Zum Sensitivitätstest der Stämme gegen diese Fungizide wurden AMM/Glucose Agarplatten mit 60 mg/mL „Congo Red“, 5-10 µg/mL Amphotericin B und 15-25 µg/mL Imidazol versetzt. Die Stämme wurden in einer Konidienzahl von 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 in je 5 µL AMM/Glucosemedium aufgetropft.

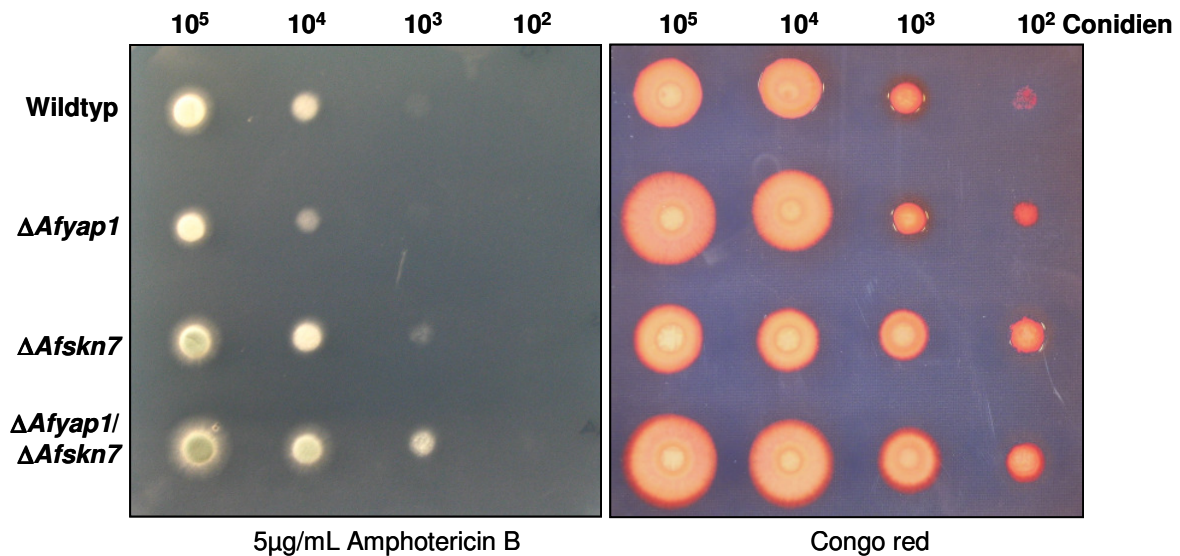


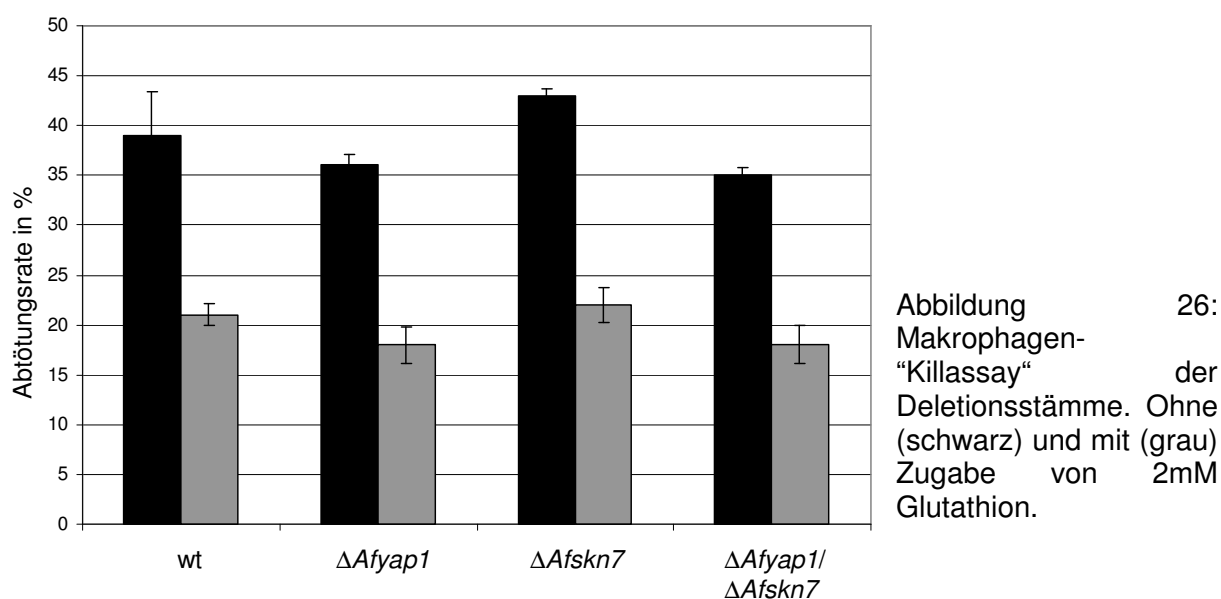
Abbildung 25: Test der Mutantenstämme gegen Amphotericin B und Congo Red. Agarplattentest des Wildtyps und der Deletionsstämme gegen 5 µg/mL Amphotericin B und 60 mg/mL Congo Red. Konidien wurden entsprechend der angegebenen Verdünnung aufgetropft und die Agarplatte wurde anschliessend 18-42 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Sensitivität der Stämme gegen die Fungizide wurde nach 42 Stunden Inkubation bei 37 °C durch Messen der Kolonieradien bestimmt (Abbildung 25). Es wurden keine Sensitivitätsunterschiede der getesteten Stämme gegen Imidazol beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Deletion von *Afyap1* erhöhte die Sensitivität von *A. fumigatus* gegen Amphotericin B. Beim $\Delta Afskn7$ -Stamm wurde eine verringerte Sensitivität gegen Amphotericin B im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Abbildung 25). Der Doppeldeletionsstamm zeigte eine höhere Resistenz gegen Amphotericin B im Vergleich zum $\Delta Afskn7$ -Stamm.

Die Deletion des *Afyap1* Gens hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität von *A. fumigatus* gegen „Congo red“. Die Deletion von *Afskn7* führte zu einer erhöhten Resistenz von *A. fumigatus* gegen „Congo Red“. Der Doppeldeletionsstamm zeigte eine vergleichbare Resistenz gegen „Congo Red“ wie der $\Delta Afskn7$ Stamm. Die Stämme zeigten keinen Wachstumsunterschied auf Agarplatten mit 5 mg/mL Glucanex, 0,2 mg/mL Calcoflour und 15-25 µg/mL Imidazol (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich führt die *Afskn7* Deletion zur Resistenz gegen Amphotericin B und „Congo red“, was seine Ursache u.a. in einer veränderten Oberflächenstruktur der Konidien und Hyphen haben könnte.

3.6 Makrophagen „Killassay“.

Die erste Abwehrlinie des Immunsystems des Wirtes gegen *A. fumigatus* stellen die Alveolar-Makrophagen dar. Die Detektion von Konidienoberflächenproteinen durch Alveolar-Makrophagen ist ein spezifischer, rezeptorvermittelter Prozess. Pathogenerkennung löst bei den Alveolar-Makrophagen Zytokinsekretion aus, die zur Akquirierung weiterer Makrophagen und neutrophiler Granulozyten führt. Ausserdem wird die Produktion von ROI und NO Radikalen induziert. Um den Effekt der Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* auf die Abwehr des Pilzes gegen Makrophagen zu testen, wurde die Abtötungsrate von Konidien nach Koinkubation mit Makrophagen bestimmt. Makrophagen der Zelllinie MH-S wurden in



einem Zahlenverhältnis von 1:1 mit Konidien für 6 Stunden bei 37 °C in 5% (v/v) CO₂ koinkubiert. Nach mehreren Waschschritten, in denen adhärierte und nicht phagozytierte Konidien abgespült wurden, wurden die Makrophagen lysiert und die auskeimenden Konidien im Mikroskop ausgezählt (Abbildung 26). Alle getesteten Stämme wurden mit der gleichen Rate durch Makrophagen abgetötet. Die Zugabe von 2mM Glutathion reduzierte die Sterberate der *A. fumigatus* Konidien aller Stämme um die Hälfte (Abbildung 26).

Die NADPH Oxidase Nox1 ist für die ROI Produktion der Makrophagen verantwortlich. Expressionsstudien zeigen eine Induktion von *nox1* in den frühen Stadien der Infektion mit *A. fumigatus* im Mausmodel (Dubourdeau *et al.*, 2006b). Die Zugabe von 16µM DPI inhibiert die Aktivität der Nox1 und reduziert den „oxidative burst“ von Granulozyten bei Pathogenerkennung (Lessing *et al.*, 2007). Im Makrophagenassay wurde die Abtötungsrate der Pilze durch die Zugabe von DPI leicht erhöht, vermutlich da diese DPI Konzentration toxisch für *A. fumigatus* Konidien ist (Daten nicht gezeigt) (persönl. Mitteilung, O. Kurzai).

Die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* hatte keinen Effekt auf die Überlebensrate des Pilzes bei Koinkubation mit Makrophagen. Da die Zugabe von Glutathion die Abtötungsrate des Pilzes reduziert, ist der Einfluss von ROI bei der Abwehr gegen *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen wahrscheinlich. Ungeklärt ist, warum alle Deletionsstämme gleich schnell

durch Makrophagen getötet werden, wenn sie eine erhöhte Sensitivität gegen ROI aufweisen und die Glutathionzugabe das „killing“ verringert. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden weitere infektionsähnliche Experimente durchgeführt.

3.7 Nachweis von ROI aus neutrophilen Granulozyten mit Hilfe von Cytochrom C Reduktion.

Die von den Granulozyten während der Koinkubation mit Hyphen produzierten ROI können durch einen Cytochrom C basierten Test im Photometer nachgewiesen werden (Babior *et al.*, 1973). Cytochrom C wird dem Überstand der Koinkubation zugegeben und dient den vorhandenen O_2^- Anionen als Elektronenakzeptor. Cytochrom C wird reduziert und absorbiert daraufhin vermehrt Licht der Wellenlänge 550nm. Für den Nachweis der ROI wurden Granulozyten aus Blutproben gesunder Spender isoliert und mit Hyphen in einem Zellzahlverhältnis von 1:10 koinkubiert.

Abbildung 27: Cytochrom C-Reduktionsassay.

A) Cytochrom C-Reduktionsverlauf während der Koinkubation mit PMNs gemessen von drei biologischen Replikaten.
B) Cytochrom C-Reduktionsverlauf bei Koinkubation von PMNs mit Wildtyp (schwarz), $\Delta Afyap1$ (hellblau), $\Delta Afyap1$ -Komplementstamm (dunkelblau), *otef-Afyap1-eGFP* (hellgrün), $\Delta Afskn7$ (orange) oder $\Delta Afskn7$ oder $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ (bordeau) Hyphen.

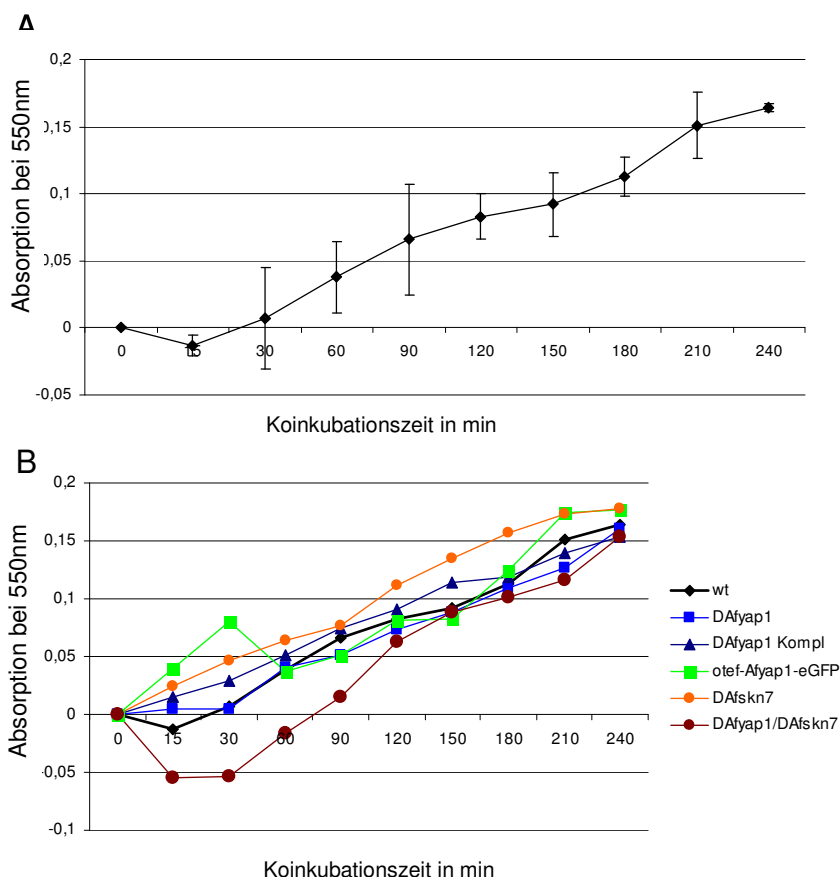


Abbildung 27A zeigt den zeitlichen Verlauf der Cytochrom C-Reduktion bei der Koinkubation von *A. fumigatus* Wildtyp mit PMNs. Der Versuch wurde mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die große Variabilität der Reaktivität der Spendergranulozyten führte zu den hohen Standardabweichungen der Messwerte. Als Negativkontrolle wurde der Versuchsansatz mit 30mg/mL Superoxiddismutase aus Pferdeherzen (Merck) versetzt, die zu einer sofortigen Umsetzung der Superoxidanionen zu H_2O_2 führte. Der Kontrollversuch zeigte dementsprechend keine Reduktion von Cytochrom C (Daten nicht gezeigt). Als

Positivkontrolle wurde der Koinkubationsansatz mit 2mM Menadion versetzt, was zu einem raschen Anstieg der Absorption bei 550nm führte. Der Endpunkt dieser Messreihe mit Menadion lag bei einer Absorption von 0,7 bei 550nm (nach Abzug des Blindwertes).

Bei der Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit Hyphen der Deletionsstämme $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ konnte im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der Menge freigesetzter ROI detektiert werden (Abbildung 27B). Die Cytochrom C Reduktionsraten verliefen in allen Koinkubationsversuchen etwa gleich, d.h. mit ähnlicher Steigung. Die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* hat demzufolge keinen Effekt auf die Stimulation der ROI Produktion von neutrophilen Granulozyten. Ein Infektionsmodell, in dem nicht alle Immuneffektorzellen supprimiert sind (wie im Cyclophosphamidmodell) könnte bei der Analyse der Rolle von ROI in der Infektion von *A. fumigatus* und der Transkriptionsfaktoren AfYap1 und AfSkn7 weitere Hinweise geben.

3.8 Mausinfektionen im Cortisonacetatmodell.

Bei der intranasalen Infektion von Cortisonacetat behandelten Mäusen mit *A. fumigatus* Konidien wurden 1×10^5 Konidien eingesetzt. Der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere wurde anschliessend mehrmals täglich untersucht. Bei der Behandlung mit Cortisonacetat kommt es zur Abschwächung des Immunsystems, da das Steroid die Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Makrophagen inhibiert. Neutrophile Granulozyten verhalten sich nach der Behandlung mit Cortisonacetat weitestgehend normal, sind jedoch in ihrer Reaktionsfähigkeit retardiert.

Die Infektion Cortisonacetat behandelter Mäuse mit *A. fumigatus* Wildtyp, $\Delta Afskn7$, $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1$ Konidien führte nicht zu einer tödlich verlaufenden Infektion der Tiere. Nur bei Infektion mit dem $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstamm starben 50% der Tiere innerhalb von 6 Tagen nach der Infektion. Da die Infektion mit *A. fumigatus* Wildtyp Konidien ebenfalls zu keiner tödlichen Infektion führte, ist die Auswertung des Infektionsversuchs nur in Hinblick auf den $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstamm möglich. Es konnte in den bisherigen Versuchen gezeigt werden, dass die Komplementation der *Afyap1* Deletion den Wildtyp-Phänotyp in *A. fumigatus* wiederherstellte. Betrachtet man daher die Infektion mit Konidien des $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstammes als wildtypähnliche Infektion, konnte eine attenuierte Infektion mit den Stämmen $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ im Cortisonacetat-Mausmodell detektiert werden (Abbildung 28).

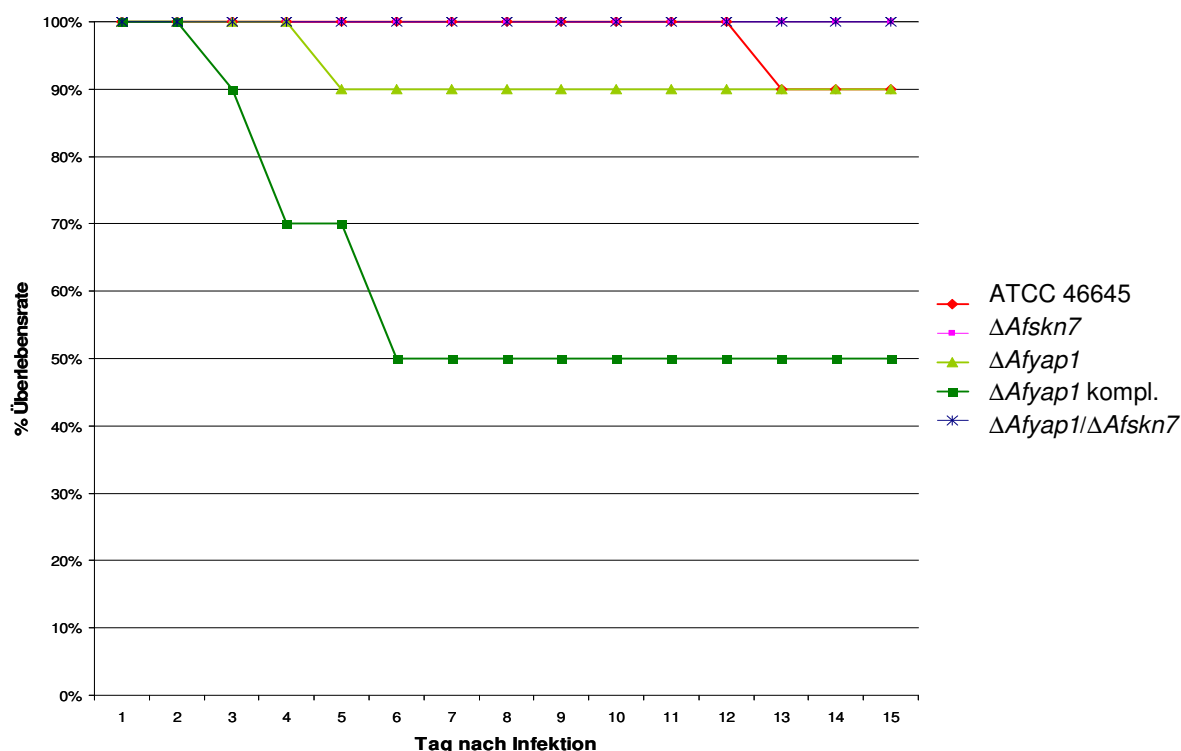


Abbildung 28: Mausinfektionsmodell mit Cortisonacetat. Nach der Immunsuppression mit Cortisonacetat wurden die Mäuse mit 1×10^5 *A. fumigatus* Konidien des Wildtyps (rot), des $\Delta Afyap1$ -Stammes (hellgrün), des $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstammes (dunkelgrün), des $\Delta Afskn7$ -Stammes (rosa) und des $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ - Deletionsstammes (blau) infiziert. Die Überlebensrate der Mäuse ist in % angegeben.

Die Schwere der Infektion kann nach Ablauf des Versuchs durch die Sektion der infizierten Mauslungen untersucht werden. Hierbei zeigten ausschließlich die Lungen der Tiere, die mit dem Wildtyp und dem $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstamm infiziert worden waren schwere Schäden inkl. Einblutung in die Lunge und Hepatisierung (I. Jacobsen; persönl. Mitteilung). Entsprechend den Infektionsverlaufstudien ist *A. fumigatus* bei allen Infektionen in das Lungengewebe eingewachsen, führte jedoch nur beim $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstamm zu tödlichen Gewebeschäden. Bei der Infektion der Mäuse mit Konidien der Deletionsstämme und des Wildtyps konnte die anfängliche Besiedelung der Lunge durch die neutrophilen Granulozyten verhindert werden, obwohl sie durch Cortisonacetat eingeschränkt aktiv waren. Es handelt sich bei diesen Daten um vorläufige Ergebnisse, die keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Rolle von AfYap1 und AfSkn7 in *A. fumigatus* bei der Infektion von Cortisonacetat behandelten Mäusen zulassen. Zumal die Abtötungsrate des $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstammes nur bei 50% lag und der Wildtyp avirulent war. Die Infektionsversuche und die anschließenden Histologieuntersuchungen müssen deshalb wiederholt werden, um die Bedeutung der beiden Transkriptionsfaktoren bei der Virulenz von *A. fumigatus* im Cortisonacetatmodell bestimmen zu können.

4. Bedeutung von NO Radikalen in *A. fumigatus* Infektionen.

Infektionen sind nicht nur mit einem Anstieg an ROI im Gewebe korreliert, infizierte Gewebe weisen auch erhöhte Stickstoffradikalkonzentrationen auf (Evans *et al.*, 1993). Die NO-Synthase ist für die Produktion von NO Radikalen in Immuneffektorzellen verantwortlich. Patienten mit chronischer Granulomatose (CGD) haben ein permanent erhöhtes Expressionsniveau des NO-Synthasegens, was besonders in Hinblick auf ihre erhöhte Suszeptibilität gegen *A. fumigatus* Infektionen interessant ist (Fang, 1997).

Da die Rolle von ROI in Infektionen bis heute fraglich ist, wurde die Detoxifizierung von NO Radikalen, unter besonderer Berücksichtigung der Infektion durch *A. fumigatus* näher untersucht.

4.1 Detoxifizierung von NO Radikalen in *A. fumigatus*.

Als NO-Donor wurde in den folgenden Experimenten Diethylentriamin-Stickstoffmonoxid /DETA NO (Sigma) benutzt, da es eine lange Halbwertszeit von 20 Stunden in Flüssigkeiten hat und in den eingesetzten Mengen nicht toxisch für *A. fumigatus* ist (Abbildung 29A) (McElhaney-Feser *et al.*, 1998).

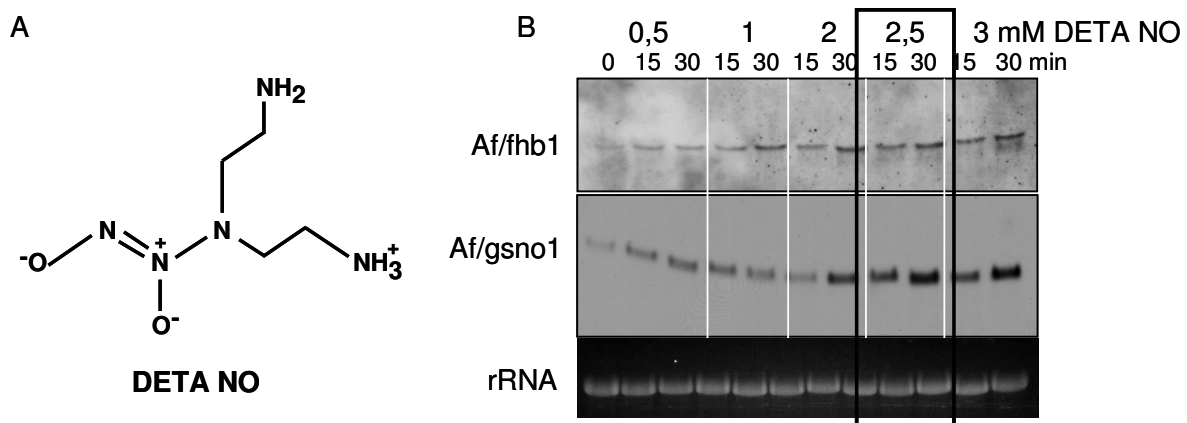


Abbildung 29: Validierung der DETA NO vermittelten Stressinduktion der Gene des Flavohämoglobins *fhb1* und der Nitrosoglutathionreduktase *gsno1* in *A. fumigatus*. **A)** Strukturformel von DETA NO. **B)** „Northern blot“ Analyse der *fhb1* und *gsno1* Expression nach Stressinduktion durch unterschiedliche DETA NO Konzentrationen. rRNA diente als Ladekontrolle.

Zur Validierung der Konzentration von DETA NO, welches NO-detoxifizierende Gene aktiviert, wurden die Homologen von *fhb1* und *gsno1* aus *Cryptococcus neoformans* in *A. fumigatus* identifiziert und als Sonden im „Northern blot“ eingesetzt (Afu8g06080/*fhb1* und Afu2g01040/*gsno*).

Eine AMM/Glucose Übernachtskultur wurde mit 0,5, 1, 2, 2,5, 3 mM DETA NO behandelt und RNA nach 0, 15 und 30 Minuten isoliert. Pro Probe wurden 10µg RNA auf ein denaturierendes Agarosegel geladen. Die Sonden wurden mit den Primern 57/58 *gsno1* und 55/56 *fhb1* (Tabelle 5) amplifiziert. Schon bei einer Konzentration von 1mM DETA NO wurde eine Induktion der *fhb1* Expression in *A. fumigatus* detektiert (Abbildung 29B). Die

Expressionsinduktion von *gsn1* wurde bei 2mM DETA NO nach 30 Minuten detektiert. In weiteren Versuchen wurden 2,5mM DETA NO zur Stressinduktion eingesetzt, da bei dieser Konzentration beide Gene eine starke Induktion der Expression zeigten. Diese Konzentration ist für *A. fumigatus* Hyphen nicht toxisch (Daten nicht gezeigt).

4.2 „Northern blot“-Analysen nach NO-Stressinduktion.

Die Induktion der Expression einiger NO-Stress-spezifischer Gene in *A. fumigatus* wurde in „Northern blot“-Analysen untersucht. Die NO Stressinduktion der Glutathionreduktase *Glr1* und der Thioredoxinperoxidase *Tsa1* wurde in *C. neoformans* beschrieben (Missall *et al.*, 2006). Als Lieferant von Reduktionsäquivalenten dient in Stresszuständen meist die Glycolyse und der Pentose-Phosphatweg. Deshalb wurde die Induktion der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nach DETA NO-Stressinduktion in *A. fumigatus* untersucht. Als Verteter des Thioredoxin-abhängigen Detoxifikationswegs wurde die Expression der Thioredoxinreduktase nach NO-Stressbehandlung bestimmt.

Eine AMM/Glucose Übernachtskultur wurde mit 2,5mM DETA NO inkubiert und RNA nach 0, 15, 30 und 60 Minuten aus dem Myzel isoliert. Die „Northern-Sonden“ wurden mit den Primern 59/60 (*fhp1*), 57/58 (*gsn1*), 55/56 (*fhb1*), 39/40 (*aspF3*), 49/50 (*glr1*), 47/48 (*trr1*) und 53/54 (*Glc-6-P-DH*) aus Tabelle 5 mit genomischer DNA als Matrize amplifiziert.

Das Flavohämoproteingen *fhp1* zeigte eine reprimierte Expression nach 15 Minuten DETA NO-Stress (Abbildung 30).

Die Gene des Flavohämoglobins *fhb1* und der Glutathionreduktase *glr1* zeigten eine induzierte Expression nach 15-30 Minuten DETA NO Behandlung (Abbildung 30). Für das Thioredoxinreduktasegen *trr1* und das Glutathionperoxidasegen *aspF3* wurde eine

kurzzeitige Repression 15 und 30 Minuten nach DETA NO-Zugabe detektiert. 60 Minuten nach Stressinduktion befanden sich die Expressionslevel wieder auf dem Ausgangsniveau (Abbildung 30). Die Thioredoxinreduktase und die Thioredoxinperoxidase sind anscheinend nicht in die Detoxifizierung von NO-Radikalen in *A. fumigatus* involviert. Das Nitrosoglutathionreduktasegen *gsn1* wurde durch DETA NO induziert und ist wahrscheinlich an der Detoxifizierung von NO

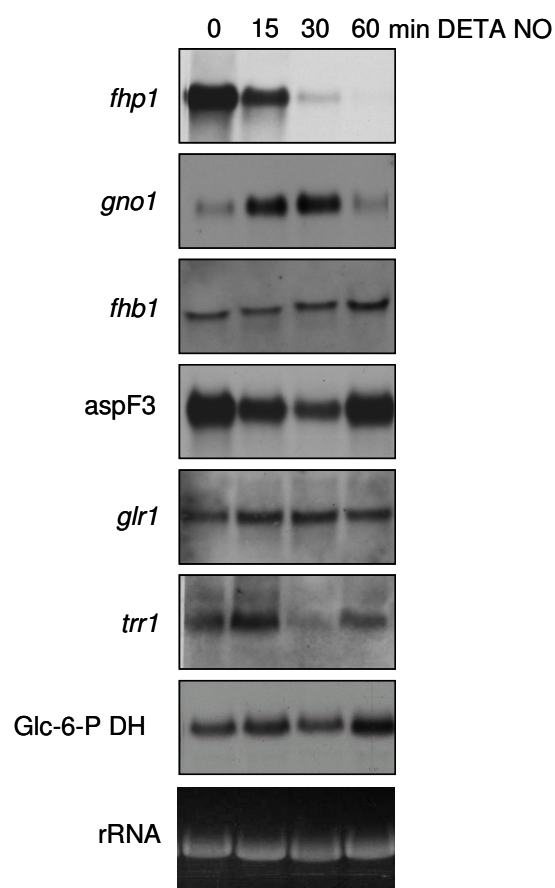


Abbildung 30: „Northern blot“-Analyse der NO Stressantwort in *A. fumigatus*. Die Stressinduktion erfolgte mit 2,5 mM DETA NO. rRNA Banden sind als Ladekontrolle des Gels gezeigt.

Radikalen in *A. fumigatus* massgeblich beteiligt. Da Expressionsanalysen nur bedingt auf die tatsächliche Proteinmenge in den Zellen schliessen lassen, wurde die NO-Stressinduktion in *A. fumigatus* in 2D-Gelen untersucht.

4.3 Proteomanalyse von *A. fumigatus* nach 2,5mM DETA NO Zugabe.

Zur Untersuchung der NO-Stressantwort von *A. fumigatus* wurde eine Übernacht AMM/Glucose Kultur mit 2,5mM DETA NO inkubiert und nach 60 Minuten zur Proteinextraktion geerntet. Myzel ohne DETA NO-Behandlung diente als Kontrolle. Beide Proteinextrakte wurden mit DIGE-Farbstoffen markiert und mit einem internen Standard auf einem 2D-Gel (pH 3-11 und 3-7) aufgetrennt (Abbildung 31A). Der Versuch wurde mit drei biologischen und je vier technischen Replikaten durchgeführt. Die Spotanalyse erfolgte anschliessend über die Decyder Software „DIA“ und „BVA“ (GE Healthcare).

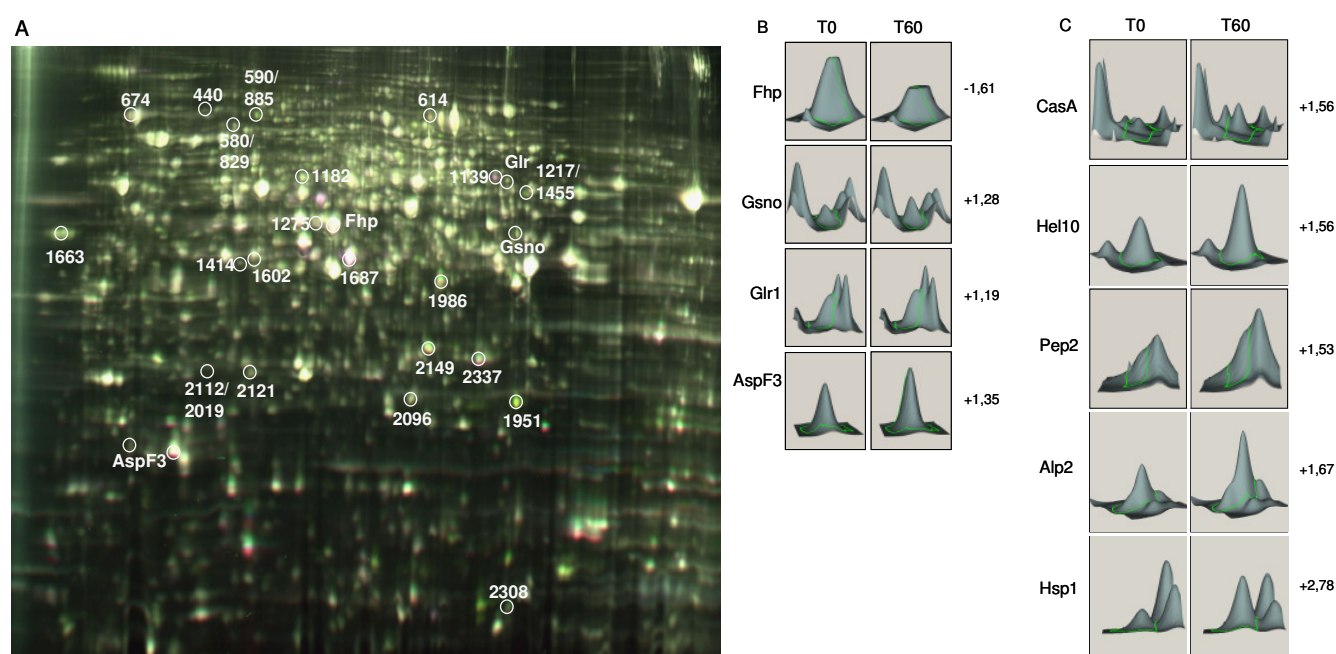


Abbildung 31: Proteomanalyse der NO Stressantwort von *A. fumigatus*. **A)** 2D DIGE Gel des DETA NO behandelten Wildtyps T0 (Cy3) versus T60 (Cy5). Der interne Standard wurde Cy2 gefärbt. IPG Streifen mit pH Gradient 3-11/24cm. Spots aus Tabelle 11 sind weiß markiert und nummeriert. **B)** Schematische Darstellung ausgewählter Spots aus Gel A) mit Hilfe der Decyder Software. Die Spotgrenzen sind grün umrandet. **C)** Schematische Darstellung wichtiger Spots aus A) und Tabelle 11.

Als signifikant wurde eine Spotvolumenveränderung angesehen, wenn sie über dem Wert der zweifachen Standardabweichung aller Spots lag. Differentiell regulierte Proteine wurden aus Ruthenium-nachgefärbten Gelen isoliert, tryptisch verdaut und in der MS-Analyse identifiziert. Die identifizierten Proteine und ihre Regulation unter NO-Stress sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Proteomveränderung von *A. fumigatus* nach 60 Minuten 2,5mM DETA NO Stress.

	Regulation	Accession	Protein
Antioxidative Proteine			
580	+1,53	gi 2431866	Katalase
590	+1,97	gi 2431866	Katalase
614	+1,55	gi 70983023	bifunktionale Katalase-Peroxidase Cat2
829	+1,73	gi 70986104	Myzeliale Katalase Cat1
885	+1,56	gi 70983023	bifunktionale Katalase-Peroxidase Cat2
2121	+1,68	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1
2112	+1,58	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1
1951	+1,52	gi 70993650	Mn Superoxiddismutase SodB
2337	+3,92	gi 70996138	Mn Superoxiddismutase MnSOD
2308	+2,07	gi 71001902	Cytochrom C Oxidase Polypeptid Vib
2405	-1,58	gi 146322777	Cytochrom C UE Vb
2028	+1,69	gi 70995928	Spermidinsynthase
1275	-2,01	gi 50788082	Flavohämoglobin
		gi 70981999	Flavohämoprotein
1414	+1,58	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)
1602	+1,59	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)
1687	-2,47	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)
228	+1,54	gi 70984840	Chaperon und Allergen Mod-E/Hsp90/Hsp1
674	+2,76	gi 70984840	Chaperon und Allergen Mod-E/Hsp90/Hsp1
750	-1,45	gi 71001294	Mitoch. Hsp70 Chaperon (Ssc70)
2019	+1,59	gi 71001910	Mitoch. Ko-Chaperon GrpE
867	+1,49	gi 70982394	AIF-like mitoch. Oxidoreduktase (Nfrl)
Glycolyse/Pyruvatm./NADPH			
1647	+1,67	gi 70998574	Alkoholdehydrogenase
1694	-1,44	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase
2402	+2,4	gi 71001496	Alkoholdehydrogenase
1698	+1,95	gi 70990724	Alkoholdehydrogenase (Zn enthaltende)
1856	+1,84	gi 70990724	Alkoholdehydrogenase (Zn enthaltende)
2077	+3,01	gi 70994214	„kurze“ Dehydrogenase
2096	+1,56	gi 70983638	Mitoch. ATPase UE ATP4
2413	+4,34	gi 71001516	Acyl CoA Bindeprotein
888	-1,44	gi 70999590	Pyruvatdecarboxylase PdcA
889	+1,43	gi 70999590	Pyruvatdecarboxylase PdcA
415	+1,47	gi 70991821	β-Glucosidase
1070	+1,46	gi 70994240	Aldehyd-Dehydrogenase
1296	+1,59	gi 70994240	Aldehyd-Dehydrogenase
1322	+1,61	gi 70992355	Aldehyd-Dehydrogenase AldA
1331	+1,41	gi 70992355	Aldehyd-Dehydrogenase AldA
755	+1,49	gi 70985198	ATP Synthase kat. UE A
678	+1,55	gi 70997109	Triosephosphatisomerase
Translationsmaschinerie			
2674	+1,77	gi 71000597	Translationsinitiationfaktor SUI1
			Eukar. Translationselongationsfaktor 1, Eef1β
1554	-2,03	gi 146322600	UE
895	+1,48	gi 71002010	Translationselongationsfaktor EF-2 UE
1139	+1,5	gi 70984206	Translationselongationsfaktor eEF-1 UE γ
508	+1,68	gi 70990924	Phenylalanyl-tRNA Synthetase, β UE

Proteasen/Proteinabbau			
440	+2,96	gi 2340046	sekretierte Dipeptidylpeptidase
2310	+2,26	gi 70984657	Ubiquitin konjugiertes Enzym (UbcM)
2255	+1,52	gi 70991377	Proteasom-Protein Pre4
2696	+1,44	gi 70991228	Ubiquitin C-terminale Hydrolase
1663	+1,53	gi 70999520	Aspart. Endopeptidase Pep2
1986	+1,67	gi 70984070	Malat-Dehydrogenase, NAD-abhängig
		gi 70997972	Autophagie-Serinprotease Alp2
Signaltransduktion			
1182	+1,57	gi 70993224	MAP kinase MpkA
1145	+1,44	gi 71000535	Phosphoserinphosphatase
Fettsäureabbau			
910	+1,47	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4
642	+1,65	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4
646	+1,45	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4
Zytoskelett			
1049	+1,57	gi 70990312	Tubulin α -1 UE
2407	+1,51	gi 71001050	„trafficking protein particle complex“ UE 2/Sedlin
Apoptose			
1217	+1,56	gi 103060424	Metacaspase CasA
1455	+1,57	gi 146322507	Metacaspase CasA
Unklassifizierte Proteine			
2267	+1,71	gi 70984753	Dienlactonhydrolase
2716	+1,96	gi 70995410	Mago Nashi Protein
1061	-2,65	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
1066	+1,72	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
850	+1,95	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
1086	+1,45	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
1101	+1,37	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
1297	+1,44	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1
1919	+1,38	gi 70985522	GNAT fam. Acetyltransferase
1929	+1,57	gi 70985300	ARP2/3 Komplex UE Arc18
1962	+1,74	gi 70985777	Kon. hypoth. Protein
1463	+3,06	gi 146322542	UPF0160 Protein MYG1
2209	+1,62	gi 70981925	Profilin Pfy1
1975	+1,51	gi 70998160	Hydrolase
2149	+1,56	gi 70991116	“high expression lethality protein Hel10”
2569	+2,01	gi 71000106	Kon. hypoth. Protein
		gi 71002366	DUF636 Protein
2604	+3,16	gi 70996827	Hypoth. Protein AFUA_5G14890
2667	+2,42	gi 146322779	Kon. hypoth. Protein
2379	+1,48	gi 146324125	Woronin body Protein HexA
1295	+1,45	gi 146324125	Woronin body Protein HexA
924	+1,99	gi 70991353	Glucosamin-Frc-6-P Aminotransferase
658	+1,51	gi 70991353	Glucosamin-Frc-6-P Aminotransferase
690	+2,50	gi 70987222	Aminoxidase
1940	+2,17	gi 70990336	ARP2/3 complex 34 kDa UE
2222	+2,62	gi 70981668	“CorA family metal ion transporter”
2233	+1,41	gi 70985777	Kon. hypoth. Protein

2334	+2,41	gi 70991807	Mitoch. Protein
2380	+3,06	gi 70990684	Kon. hypoth. Protein
2624	+1,57	gi 146322763	Kon. hypoth. Protein
2525	+3,02	gi 70992495	FKBP-type Peptidyl-Prolyl Isomerase
1586	+1,53	gi 70994660	Ornithin Carbamoyltransferase

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität beim Vergleich Wildtyp T0 gegen T60 (2,5mM DETA NO) an. Spotveränderungen von über zweifacher Standardabweichung wurden als signifikant betrachtet.

60 Minuten nach NO-Zugabe wurde die erhöhte Menge einiger ROI-detoxifizierender Proteine detektiert. Zu ihnen gehörten die Katalasen Cat1 und Cat2, Superoxiddismutase SodB und Sod1 und die Thioredoxinperoxidase Prx1 (Tabelle 11). Da bei dem Glutathionperoxidasegen *aspF3* im „Northern blot“ eine Repression der Expression nach NO-Zugabe detektiert wurde (Abbildung 30), übernimmt vermutlich die Thioredoxinperoxidase Prx1 die Detoxifizierung von NO-Stress.

Eine NO-spezifische Spotvolumenerhöhung der Proteine Fhb1 und Gsn01 wurde in *A. fumigatus* nicht detektiert, obwohl die Expression der Gene dieser Proteine unter diesen Bedingungen induziert wurde (Abbildung 29). Die Spotintensitäten dieser Proteine sind allerdings nach 60 Minuten DETA NO Stress nicht signifikant verändert (Abbildung 31). Statt des Flavohämoglobins Fhb1 wurde die Spotintensität des Flavohämoproteins Fhp1 signifikant verändert (Abbildung 31B/Tabelle 11). Fhp1 zeigte außerdem eine sauerstoffabhängige Expression in *A. fumigatus*. Die Deletion des *fhp1* Gens führte in *A. fumigatus* zu erhöhter DETA NO Sensitivität (M. Vödisch, pers. Mitteilung). Die putative Rolle des Flavohämoproteins Fhp1 bei der NO-Detoxifizierung wird später diskutiert.

Des Weiteren wurden Proteine durch DETA NO Behandlung induziert, die mit Apoptose (Metacaspase CasA) und programmiertem Zelltod („high expression lethality protein“ Hel10) in *A. fumigatus* in Zusammenhang stehen könnten (Ligr *et al.*, 2001) (Tabelle 11/Abbildung 31C). Peptidasen (440, 1663/Pep2) und Proteasen (Alp2) wurden durch NO Stress in *A. fumigatus* induziert (Tabelle 11/Abbildung 31C). Das Hitzeschockprotein Hsp1 wurde unter NO Stress ebenfalls induziert (Tabelle 11/Abbildung 31C).

DETA NO führte außerdem zur Induktion der Malat Dehydrogenase, der Triosephosphat Isomerase, der Alkohol Dehydrogenase und der Pyruvat Decarboxylase (Tabelle 11). Insgesamt induziert die NO-Zugabe die generelle Stressantwort und Proteine des Energiestoffwechsels. Die NO-Stressantwort könnte demnach bei der Infektion von *A. fumigatus* eine Rolle spielen.

4.4 Bedeutung von NO Radikalen beim Abtöten von *A. fumigatus* durch Makrophagen und Granulozyten.

Um die Rolle der NO-Radikale bei der Konfrontation von *A. fumigatus* mit Makrophagen und Granulozyten während der Infektion zu untersuchen, wurden Konfrontationsexperimente mit und ohne Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME durchgeführt. L-NAME hemmt die

NO-Synthase iNOS der Immuneffektorzellen und führt so zu einer Verminderung der NO-Produktion. In *C. albicans*-Infektionen wirkte L-NAME dem Infektionsprozess entgegen (Nagata *et al.*, 2003).

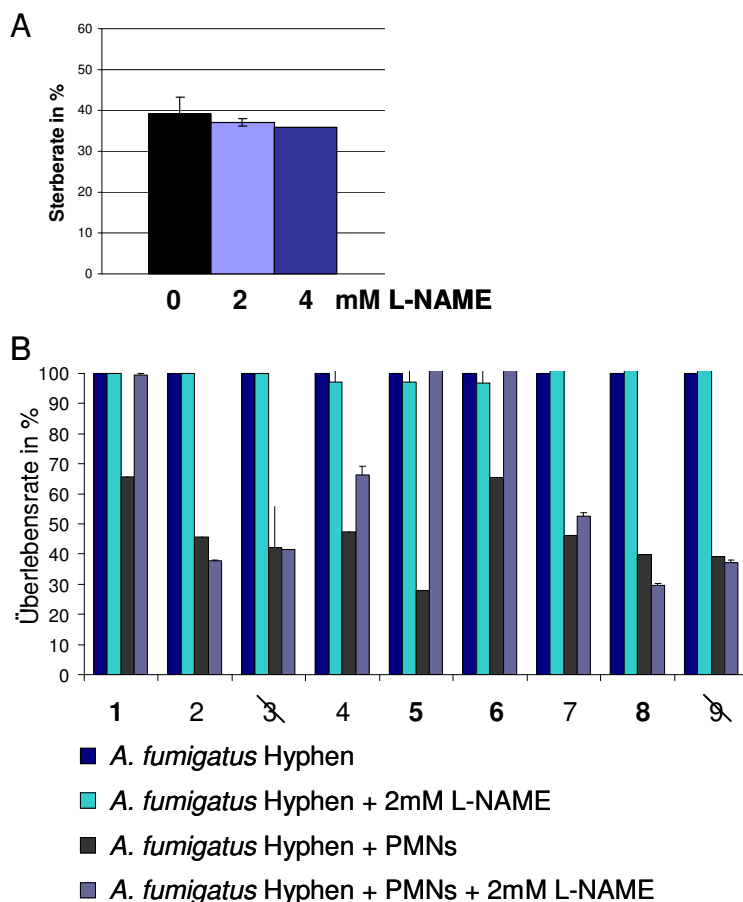


Abbildung 32: Einfluss des Nos1 Inhibitors L-NAME auf die „killassays“. **A)** Konidien koinkubiert mit Makrophagen mit 0 (schwarz), 2 (hellblau) und 4 (dunkelblau) mM L-NAME. **B)** *A. fumigatus* Wildtyp hyphen (dunkelblau) mit 2mM L-NAME (hellblau) oder PMNs (schwarz). Hyphen, PMNs und 2mM L-NAME (blaugrau). Versuch wurde mit PMNs von 9 unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Nicht signifikante Datenreihen wurden mit einer durchgestrichenen Spendernummer gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 32 A gezeigt, hatte die Zugabe von 2mM und 4mM L-NAME zum Makrophagen „kill assay“ keinen Effekt auf die Sterberate der *A. fumigatus* Konidien. Eine direkte Rolle von NO-Radikalen bei der Inaktivierung von Konidien durch Makrophagen ist daher unwahrscheinlich.

Um die Rolle von NO-Radikalen auf die „Hyphenabwehr“ von neutrophilen Granulozyten zu testen, wurden *A. fumigatus* Hyphen mit frisch isolierten, neutrophilen Granulozyten aus gesunden Spendern 180 min inkubiert und die Überlebensrate der Pilze durch Ausplattieren bestimmt. Der Test zeigte, dass 2mM L-NAME eine nicht toxische Konzentration für *A. fumigatus* Hyphen darstellen (Abbildung 32B/hellblau). Die Zugabe von neutrophilen Granulozyten zu den Hyphen in einem Zahlenverhältnis von 1:1 führte zu einer Abtötung der *A. fumigatus* Hyphen zu 50-65% (Abbildung 32B/grau). Wegen der hohen Variabilität der Daten aufgrund der unterschiedlichen Fitness der neutrophilen Granulozyten ist die Auswertung des Koinkubationsversuchs schwierig. Die Zugabe von 2mM L-NAME hatte bei 4 von 9 Versuchswiederholungen eine Erhöhung der Überlebensrate zur Folge (Abbildung 32B/graublau). Die Daten wurden statistisch mittels T-Test über alle 9 biologischen Replikate ausgewertet und nach Signifikanz geordnet. Demnach muss Versuchswiederholung 3 und 9

als nicht signifikant eingestuft werden. Sie wurden bei der Auswertung der Koinkubationsversuche nicht weiter berücksichtigt. Die Daten aus Versuchswiederholung 1, 5, 6 und 8 können als hoch signifikant eingestuft werden (pers. Mitteilung D. Albrecht). Durch die Berechnung des Mittelwertes aller Proben konnte der Effekt für L-NAME in drei der vier hochsignifikanten Datensätze bestätigt werden. Da die Standardabweichung der Daten sehr hoch ist, bleibt die Rolle von NO Radikalen bei der Konfrontation von Granulozyten und *A. fumigatus* Hyphen jedoch unklar. Den Einfluss von NO Radikalen und ROI bei der Konfrontation von PMNs mit *A. fumigatus* Hyphen kann letztendlich nur durch die Analyse des Pilzes nach der Koinkubation mit diesen Zellen bestimmt werden.

5. Analyse der Stressantwort von *A. fumigatus* nach Konfrontation mit PMNs.

Um den Infektionsablauf und die damit verbundenen Virulenzfaktoren von *A. fumigatus* näher zu untersuchen, wurden Granulozyten aus Blutproben gesunder Spender isoliert und mit *A. fumigatus* Hyphen in einem Zahlenverhältnis von 1:10 koinkubiert.

Abbildung 33 zeigt die mikroskopische Darstellung des Konfrontationsassays im Zeitverlauf. Bereits 15 Minuten nach Beginn der Koinkubation hatten erste Granulozyten an den Hyphen adhärirt. Nach 30 Minuten Koinkubationszeit waren die Hyphen von zahlreichen Granulozyten umgeben. Zu späteren Zeitpunkten wurden Hyphen detektiert, die vollständig mit Granulozyten bedeckt waren (Abbildung 33). Die frühe Stressantwort des Pilzes auf Granulozyten sollte deshalb nach 60 und 120 Minuten Koinkubation im 2D-Gel detektierbar sein.

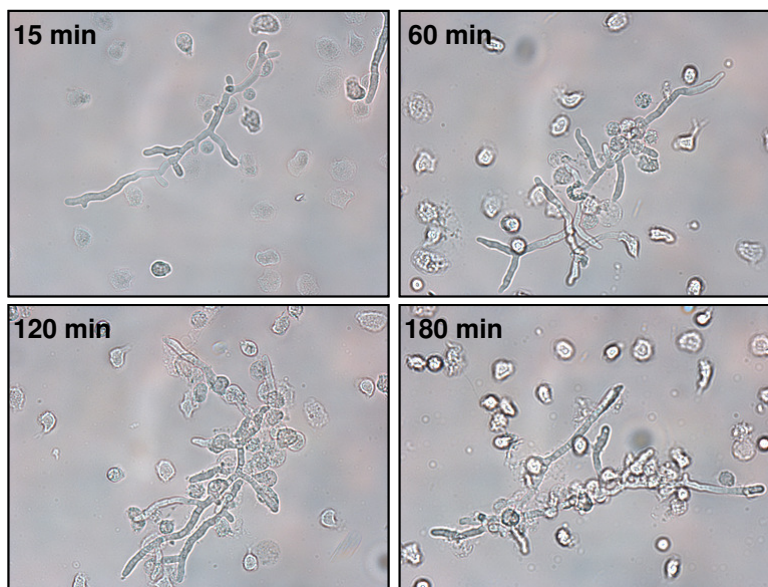
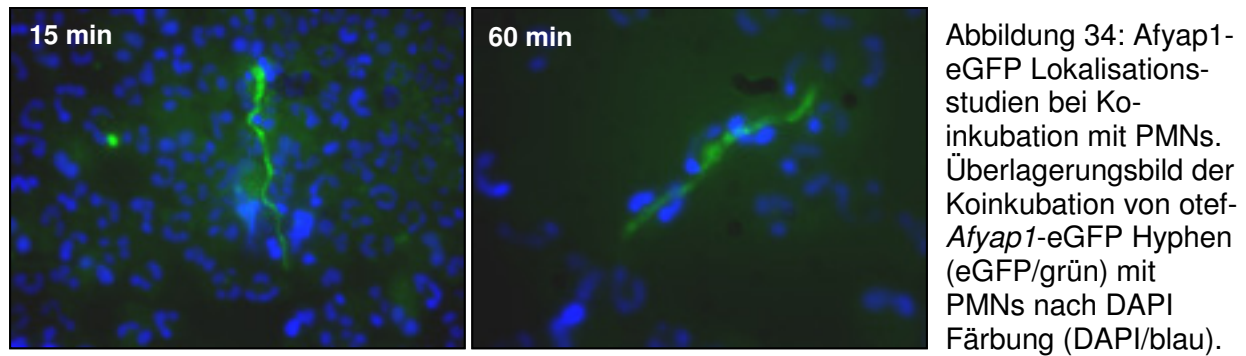


Abbildung 33: Koinkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit PMNs. Mikroskopische Darstellung der Koinkubation im Zeitverlauf.

5.1 AfYap1-Lokalisationsstudien nach PMN Konfrontation.

Um die Rolle von ROI bei der Konfrontation nochmals zu überprüfen, wurde der otef-Afyap1-eGFP Stamm mit Granulozyten koinkubiert und die Verteilung des eGFP Signals im Zeitverlauf beobachtet (Abbildung 34). Die Kerne wurden mit der DAPI Gegenfärbung sichtbar gemacht. Da Granulozyten mehrere Kerne besitzen, zeigten sie ein starkes DAPI

Signal, welches die DAPI gefärbten *A. fumigatus* Kerne überstrahlte. Bei der Verwendung des otef-Afyap1-eGFP Stammes wurde die Oberfläche der Hyphen schon nach 15 Koinkubationen mehrfach mit Granulozyten besetzt. Nach 60 Minuten Koinkubation waren die Hyphenoberflächen komplett mit Granulozyten bedeckt, trotzdem zeigte sich keine deutliche Kernlokalisierung von AfYap1 (Abbildung 34).



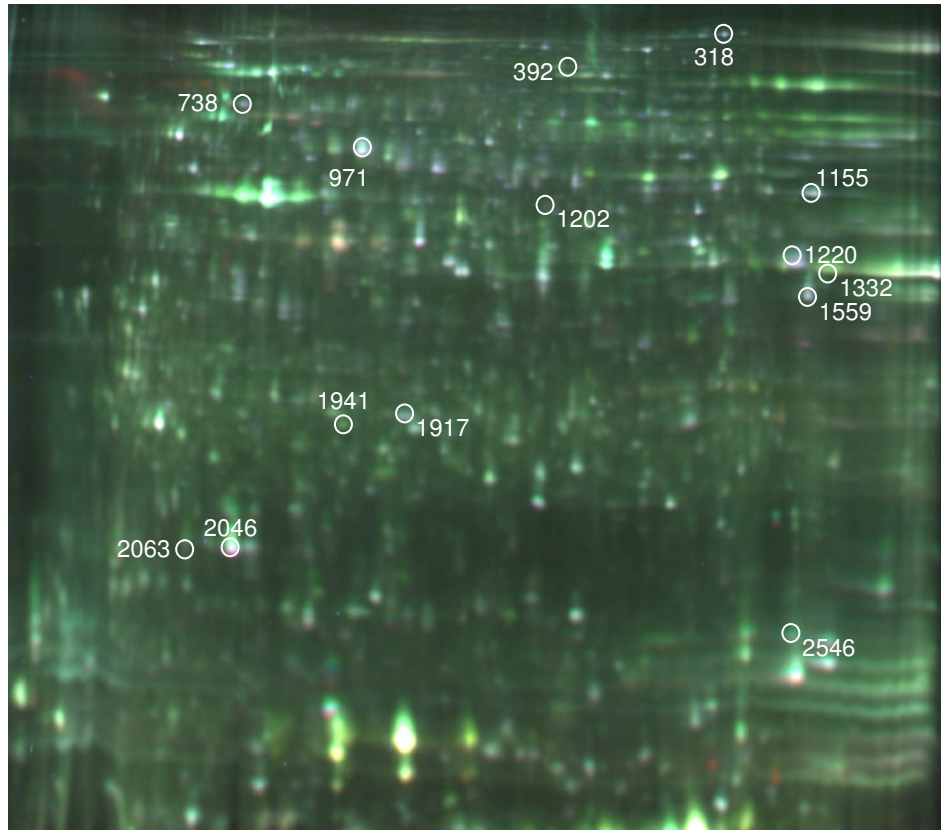
Das eGFP Signal wurde partiell fragmentiert detektiert und war nicht mehr gleichmässig in der Hyphe verteilt. Eine eindeutige Kernlokalisierung von AfYap1 war bei der Konfrontation mit Granulozyten allerdings nicht detektierbar. Wie bereits in vorhergegangenen Versuchen dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint AfYap1 nicht an der Abwehr von neutrophilen Granulozyten beteiligt zu sein. Die Analyse der Proteomveränderung von *A. fumigatus* nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten sollte dagegen Proteine aufzeigen, die an dieser Abwehr beteiligt sind.

5.2 2D-Gelanalyse von *A. fumigatus* nach Konfrontation mit PMNs.

Um die Antwort von *A. fumigatus* auf die Konfrontation mit Granulozyten zu analysieren, wurden neutrophile Granulozyten von fünf verschiedenen, gesunden Spendern isoliert. Nach Ablauf der Koinkubationszeit wurde dem Ansatz 1mL Probe entnommen und mehrfach mit eiskaltem Wasser und Triton-X-100 gespült, um die Neutrophilen zu lysieren und Zellfragmente zu entfernen. Proteinextrakte wurden aus den reisolierten *A. fumigatus* Hyphen 0, 60, 120 und 180 Minuten nach Koinkubation gewonnen und in 2D DIGE Gelen pH 3-11/24cm aufgetrennt. Die Gele wurden mit einem Cy2-markierten internen Standard beladen, der sich aus allen verwendeten Proben zu gleichen Teilen zusammensetzte. Die Versuchsauswertung und die Normalisierung der Daten erfolgte mittels der „Decyder 6.5 Software“ von GE Healthcare. Signifikant differenzielle Proteinspots wurden in der „Decyder Software“ nach einem „fold change“ der zweifachen Standardabweichung gefiltert. Anschliessend erfolgte die Signifikanzberechnung der Proteinspots mittels ANOVA („analysis of variance“) ebenfalls in der „Decyder Software“. Der Versuch wurde mit neutrophilen Granulozyten aus fünf verschiedenen Spendern in zwei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt, um die Spendervariabilität in den Versuch miteinzubeziehen.

Die Zeitreihe kann daher nur versuchsbezogen und nicht für alle neun Gele zusammen ausgewertet werden. Deshalb ist Tabelle 12 in zwei Abschnitte unterteilt. Abbildung 35A/B zeigt jeweils ein DIGE Gel aus Versuchreihe 1 und 2.

A



B

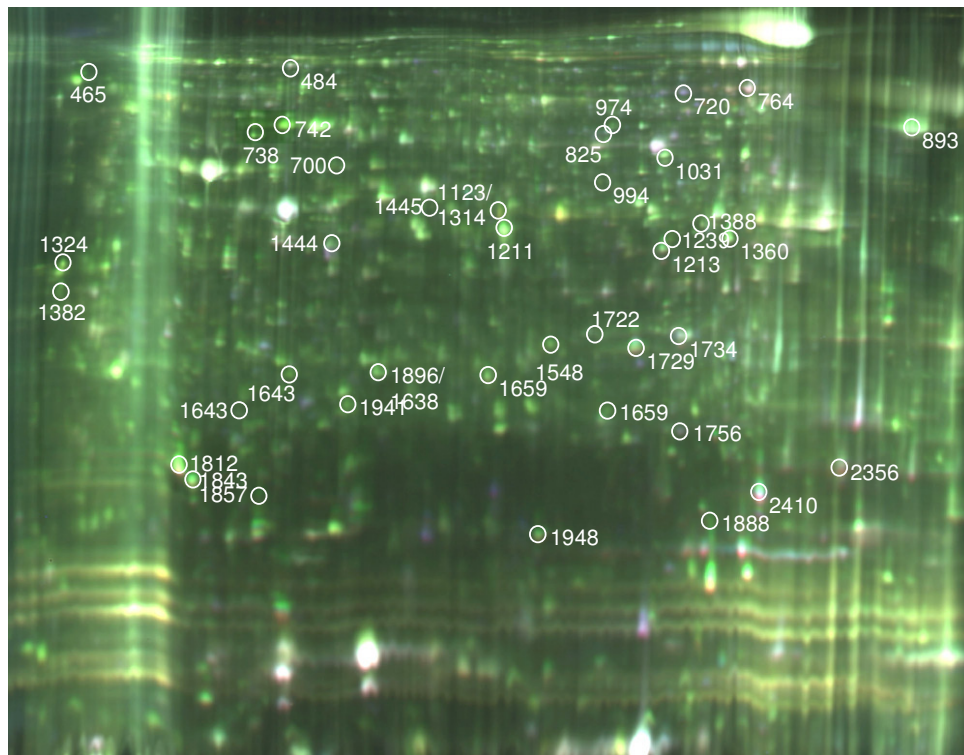


Abbildung 35: 2D Gele der granulozytenvermittelten Stressantwort von *A. fumigatus* Hyphen. **A)** Beispielgel aus Versuch 1. **B)** Beispielgel aus Versuchsreihe 2.

Tabelle 12 zeigt die Zusammenstellung aller identifizierten *A. fumigatus* Proteine und ihre Regulation während der Konfrontation mit PMNs.

Versuch 1			
Gel/Spotnummer	Regulation	Accession-Nr.	Protein
T0 vs T60			
DIA 22.11.07			
Spender 1			
392	+1,59	gi 70992645	mitochondriale Aconitathydratase, putativ
590	+2,03	gi 70984170	Aktin Act1
702	+2,08	gi 70997705	ATP Synthase F1, beta Untereinheit, putativ
728	+1,65	gi 70988960	Monooxygenase, putativ
971	-1,93	gi 70991527	NmrA-, „like family“ Protein
1350	+1,63	gi 70997968	Transaldolase
2183	+1,64	gi 70990900	40S ribosomales Protein S12
			konserviertes hypoth. Protein <i>Neosartorya</i>
2223	-2,41	gi 119472505	<i>fischeri</i>
2437	-2,50	gi 145235469	Hypoth. Protein An03g05020 [<i>Aspergillus niger</i>]
2487	+7,53	gi 70981456	Feruloylsterase, putativ
2538	+1,89	gi 70997942	Calcineurin katalyt. UE CnaA

T0 vs T60
DIA 22.11.07
Spender **2**

558	-2,64	gi 70986458	Coenzyme A Transferase, putativ Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
1202	+1,50	gi 70985278	GpdA
1215	-2,24	gi 113212	ACT1_ABSGL Aktin-1
1220	+1,52	gi 70991497	Autophagie Protein Apg5, putativ
1409	-3,29	gi 70982512	Cap -binde Protein
2046	+1,96	gi 70984685	Allergen Asp F3
2063	+1,65	gi 70984685	Allergen Asp F3
2092	3,13	gi 70993070	Konserviertes hypoth. Protein
2146	+1,52	gi 70990614	Eukar. Translationsinitiationsfaktor eIF-5A Cobalamin-abhängige Methioninsynthase
290	+1,52	gi 70994626	MetH/D
318	+1,59	gi 70992645	Mitochondriale Aconitathydratase, putativ
1157	+1,60	gi 70999466	Fructose-bisphosphataldolase, class II
1332	+1,74	gi 70986899	Malatdehydrogenase, NAD-abhängig
1701	+2,00	gi 70997109	Triosephosphatisomerase

T120 vs T180
DIA 22.11.07
Spender **1**

738	-2,47	gi 71001164	Antigenes mitochondriales Protein HSP60
1159	+1,88	gi 113277	ACTG_EMENI Aktin, gamma
1559	-1,91	gi 70986899	Malatdehydrogenase, NAD-abhängig
1941	+1,67	gi 70994244	Mitochondriales Peroxiredoxin Prx1, putativ
2612	+3,07	gi 70981456	Feruloyl-esterase, putativ
384 A		gi 71001496	Alkoholdehydrogenase, putativ
971	-1,75	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22
1055	-2,54	gi 70994774	Glutamat/Leucine/Phenylalanin/Valin DH
1073	+2,33	gi 70995281	Phosphoglyceratkinase PgkA, putativ
1128	-2,31	gi 70984206	Translationselongationsfaktor eEF-1 γ UE
1155	-1,80	gi 70984828	Citratsynthase (Cit1), putativ
1468	-1,68	gi 70997968	Transaldolase
1672	+1,96	gi 67901456	Hypoth. Protein AN7715.2 [A. nidulans]
1826	+1,54	gi 146324125	Woronin body Protein HexA, putativ
1847	+1,53	gi 70998905	Enoyl-CoA Hydratase/Isom. „family“ Protein
1917	-1,93	gi 70997109	Triosephosphatisomerase
	+1,84	gi 70991893	3'(2'),5'-Bisphosphatnukleotidase
2414	-1,55	gi 71000343	peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase/Cyclophilin
2546	+1,88	gi 71001516	Acyl CoA Bindeprotein

Versuch 2
Gel1/T0vsT120,
Spender **3**

465	+4,45	gi 70981668	CorA family Metal- Ion -Transporter, putativ
665	+1,75	gi 71000749	Glutamatcarboxypeptidase, putativ
738	+3,21	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22
742	+2,52	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22
928	+1,63	gi 70995343	S-Adenosylmethioninsynthetase
1123	+3,14	gi 70993334	G-Protein Complex β Untereinheit CpcB
1211	+2,77	gi 70993334	G-Protein Complex β Untereinheit CpcB
1239	+2,41	gi 70986899	Malatdehydrogenase, NAD-abh.
1324	+2,50	gi 146322600	euk Transl. Elongationsfaktor 1 UE Eef1- β

1382	+2,68	gi 146322600	euk Transl. Elongationsfaktor 1 UE Eef1-β
1548	+1,93	gi 70995380	Adenylylsulfatkinase
1638	+1,70	gi 70994244	mitochondriales Peroxiredoxin Prx1
1643	+2,59	gi 70994244	mitochondriales Peroxiredoxin Prx1
1679	+1,57	gi 70988905	Konserv. Hypoth. Protein
		gi 70985278	Glycerinaldehyd 3-Phosphate DH GpdA
			mitochondriale ATPase Untereinheit ATP4, putativ
1715	+2,04	gi 70983638	putativ
1729	+1,97	gi 70994950	Guanylatkinase
1766	+1,54	gi 70984364	ATP Synthase D Kette, mitochondrial, putativ
1793	+2,87	gi 70995808	60S ribosomales Protein L5, putativ
1812	+2,27	gi 70984685	Allergen Asp F3
1843	+1,76	gi 70990614	Eukar. Translationsinitiationsfaktor eIF-5A
1857	+2,25	gi 70981668	CorA „family“ Metal-Ion-Transporter, putativ
1888	+2,52	gi 70981668	CorA „family“ Metal-Ion-Transporter, putativ
1899	+1,73	gi 70984591	Polypeptid-assoz. Complex (NAC)

Gel2/T60vsT180,
Spender **3**

412	-1,94	gi 70994557	Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase
620	-1,92	gi 146323557	Sensor Histidin Kinase/„Response regulator“
713	+1,53	gi 146323452	Rekombin. „hotspot“-binde Protein (Translin)
994	+2,00	gi 70984134	NAD-abh. Formatdehydrogenase AciA/Fdh
1043	+1,71	gi 70983454	MFS Transporter, putativ
1077	-1,91	gi 70992617	NADH-Ubiquinon Oxidoreductase 39 kDa UE
1213	+2,15	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase, putativ
1250	-1,99	gi 70992231	„HAD superfamily“ Hydrolase, putativ
1566	-1,96	gi 70988949	RNA Polymerase II Elongationsfaktor Rtf1p
1659	+1,55	gi 70998901	Hitzeschockprotein Hsp30/Hsp42, putativ
1756	-1,56	gi 70996138	Mn-Superoxiddismutase MnSOD
1914	+2,31	gi 70984591	Nascent Polypeptid-assoz. Complex (NAC)

Gel3/T0vsT120,
Spender **4**

489	+2,08	gi 146323966	integrales Membranprotein
612	+2,11	gi 70983678	Hypoth. Protein AFUA_8G05650
694	+1,93	gi 146324886	AAA family ATPase, putativ
705	+2,29	gi 70985436	RAN small monomeric GTPase (Ran), putativ
		gi 70990728	Ubiquitin-Protein Ligase (Hul4), putativ
720	+2,26	gi 70991575	Pyruvatkinase
740	+2,84	gi 71001310	Actin Zytoskeletprotein (VIP1), putativ
764	+3,76	gi 44890043	Hypoth. Protein
810	+1,53	gi 70984557	Acetylglutamatkinase, putativ
825	+2,05	gi 70983378	Cholinoxidase (CodA), putativ
893	+1,58	gi 146322501	Translationselongationsfaktor EF-1 α UE
1015	+2,29	gi 70997323	Konserv. hypoth. Protein
1105	+2,00	gi 70991893	3'(2'),5'-Bisphosphatnukleotidase
1162	+2,95	gi 70999137	40S ribosomales Protein S0
1163	+1,99	gi 70998757	Konserv. hypoth. Protein
1170	-2,02	gi 70991585	WD repeat Protein
1247	+1,68	gi 70991156	„CBS and PB1 domain“ Protein
1273	+1,66	gi 70992133	Aldehydreduktase (AKR1), putativ
1388	+2,06	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase, putativ
1444	+1,71	gi 70983346	Hsp70 Chaperon (HscA), putativ
1793	+1,78	gi 70982225	Xanthin-Guaninphosphoribosyltransferase Xpt1

1896	+1,65	gi 70994244	mitochondriales Peroxiredoxin Prx1, putativ
1941	+1,88	gi 70981668	„CorA family“ Metal-Ion-Transporter, putativ
1972	+1,62	gi 70983638	mitochondriale ATPase UE ATP4, putativ
1986	+1,85	gi 70988905	Konserv. hypoth. Protein
		gi 70985278	Glycerinaldehyd 3-Phosphat DH GpdA
1990	+1,65	gi 70999137	40S ribosomales Protein S0

Gel4/T60vsT180,
Spender **4**

703	+4,23	gi 70982372	UDP-N-Acetylglucosaminpyrophosphorylase
974	+1,51	gi 70981668	„CorA family“ Metal-Ion-Transporter, putativ
1067	+1,67	gi 70983784	Hypoth. Protein AFUA_8G06170
1404	+1,51	gi 70992617	NADH-Ubiquinonoxidorreduktase 39 kDa UE
1445	+2,65	gi 70991673	Lactoyl-Glutathionlyase
1546	+1,89	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase, putativ
2356	-2,87	gi 70985228	„Mst3-like“ Proteinkinase, putativ
2410	-2,96	gi 71001246	Proteinkinase (NpkA), putativ
2742	-2,66	gi 70991156	„CBS and PB1 domain“ protein

Gel5/T0vsT180,
Spender **5**

394	-3,78	gi 70991066	Konserv. hypoth. Protein
429	+2,08	gi 146323362	Kationentransportprotein ChaC, putativ
464	-11,3	gi 70994782	Hypoth. Protein AFUA_4G06580
473	+1,75	gi 70989201	Kinesin „family“ Protein
484	+2,31	gi 70995660	Translationselongationsfaktor EF-Tu
1031	+1,77	gi 70984206	Translationselongationsfaktor eEF-1 γ UE
1062	+1,52	gi 70986458	Coenzym A Transferase, putativ
1314	+2,05	gi 70993334	G-Protein Komplex β UE CpcB
1360	+2,68	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase, putativ
1722	-3,58	gi 71002010	Translationselongationsfaktor EF-2 UE, putativ
1734	-3,81	gi 70991156	CBS and PB1 domain Protein
		gi 70989761	alkalische Lipase, putativ
2166	-4,04	gi 70990380	dUTPase (Dut), putativ

Gel6/T60vsT120,
Spender **5**

484 b	+3,67	gi 70995930	Transketolase TktA
700	+1,55	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22
713	-3,56	gi 70997529	APSES Transkriptionsfaktor, putativ
719	+1,83	gi 71002144	Proteinkinase, putativ
1655	-2,35	gi 71001838	Hypoth. Protein AFUA_2G12690
		gi 70994498	DNA Polymerase Δ UE 2, putativ
1885	-2,35	gi 70991893	3'(2'),5'-Bisphosphatnukleotidase
1925	-2,11	gi 70984591	nascent Polypeptid-assoz. Komplex (NAC)
1940	+1,52	gi 70985578	„GNAT family“ N-acetyltransferase, putativ
1948	-2,31	gi 17426133	Cu,Zn Superoxiddismutase

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität an. Die Granulozytenspender sind mit grünen Nummern markiert und bezeichnen jeweils ein biologisches Replikat und den verwendeten Granulozytenspender

In Abbildung 36 sind interessante Spots aus Tabelle 12 im Zeitverlauf der Koinkubation dargestellt. Die grauen Linien der schematischen Darstellung zeigen die

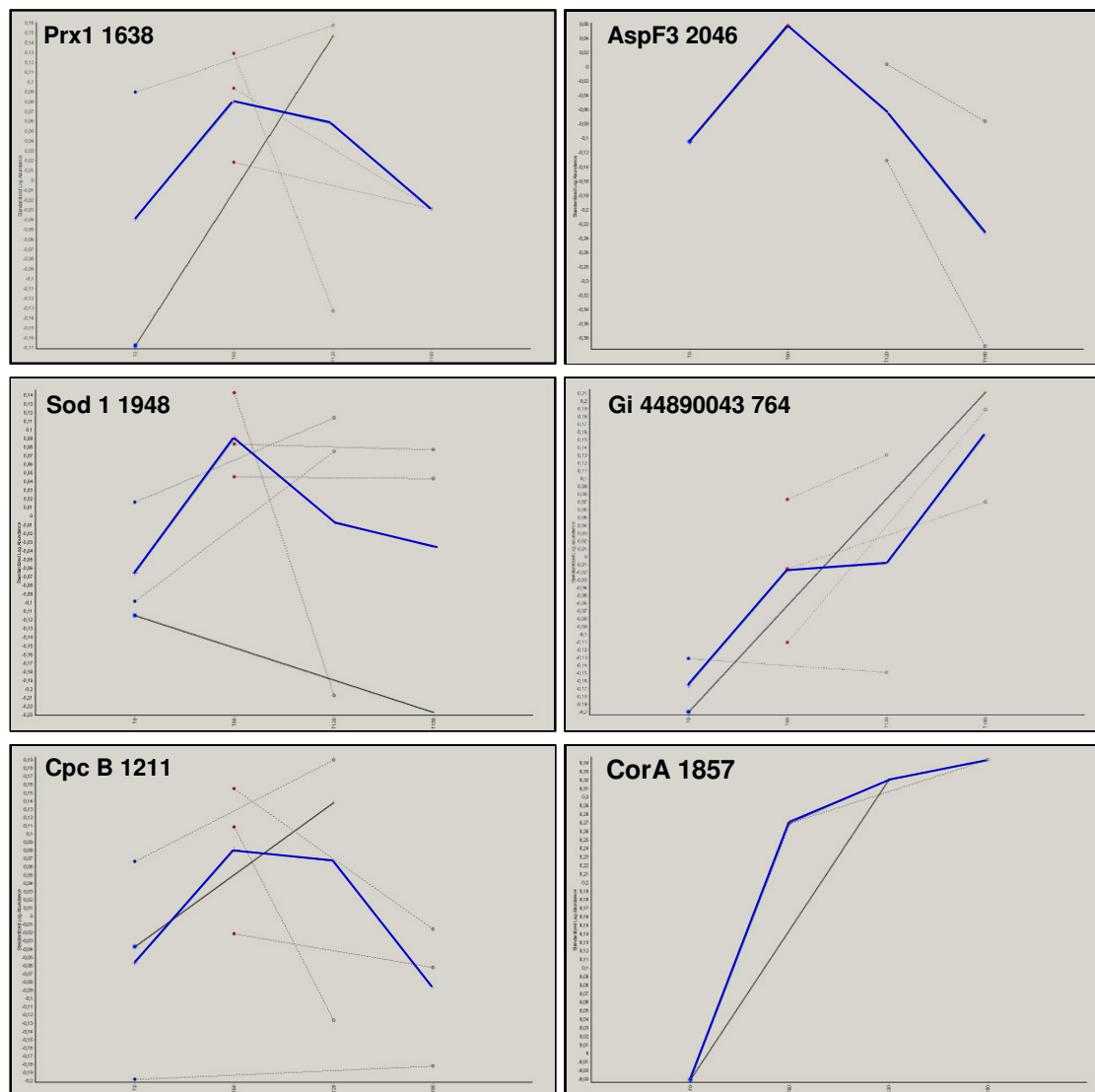


Abbildung 36: Schematische Darstellung einiger Spots aus Tabelle 12 und Abbildung 36 A/B im Zeitverlauf. graue Einzelstriche kennzeichnen die Spotintensitätenveränderung, die innerhalb eines DIGE Gels detektiert wurde. Die blaue Trendlinie zeigt die theoretische Veränderung über den gesamten Versuchszeitraum an (Decyder, GE Healthcare).

Spotintensitätenveränderung in den durchgeführten 2D-Gelen an. Die blaue Trendlinie gibt die theoretische, extrapolierte Spotintensität über den gesamten Zeitverlauf an. Abhängig vom Granulozytenspender wurden sehr unterschiedliche Proteinspotveränderungen detektiert. Trotzdem zeigte sich eine generelle Induktion der ROI-Antwort durch die Thioredoxinperoxidase Prx1 und AspF3 in den frühen Stadien der Koinkubation (Tabelle 12/Abbildung 36). Die Hitzeschockproteine Hsp30/Hsp42 und Hsp70 wurden ebenfalls induziert. Die Superoxiddismutasen Sod1 und SodB zeigten in der theoretischen Berechnung der Spotintensitätenveränderung eine kurzzeitige Induktion in den ersten 60 Minuten der Konfrontation mit neutrophilen Granulocyten, obwohl in einigen Spendern ein verringertes Proteinspotvolumen detektiert wurde (Abbildung 36/Tabelle 12). Abbildung 36 zeigt den

Zeitverlauf der Spotvolumenveränderung für Sod1 exemplarisch für beide Superoxiddismutasen, da sie sich unter diesen Bedingungen gleich verhielten. Der Proteinspot des hypothetische Proteins gi 44890043 zeigte nach 120 Minuten Granulozyteninduktion ein 3,76 fach erhöhtes Spotvolumen. Es weist grosse Ähnlichkeit zu dem C6 Transkriptionsfaktor Afulg14460 aus *A. fumigatus* auf. Die Funktionen beider Proteine sind bisher nicht bekannt. Im Zeitverlauf der Konfrontation mit Neutrophilen zeigte der Proteinspot eine stetige Volumenzunahme, was eine bedeutende Rolle bei dieser Stressinduktion wahrscheinlich macht (Abbildung 36). Wie bei der Stressinduktion mit DETA NO wird auch im Koinkubationsversuch mit Granulozyten der Energiestoffwechsel modifiziert. Die Transaldolase, Malatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase, Pyruvatkinase, Formatdehydrogenase und Citratsynthase zeigten erhöhte Spotvolumina nach Koinkubation mit Granulozyten. In einigen Spendern wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Enolase aus *A. fumigatus* durch die Granulozyten Koinkubation induziert. Die Enolase wurde in *A. fumigatus* Patienten ebenfalls als Allergen (AspF22) identifiziert (Crameri, 1999). Das Autophagieprotein Apg5 wurde ebenfalls durch Granulozytenstress in *A. fumigatus* induziert (Tabelle 12). Autophagie ist der Abbau zelleigener Proteine und Organellen zu deren Erneuerung zur Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Der strikt regulierte Prozess der Autophagie kann auch zu einem programmierten Zelltod führen (Yorimitsu & Klionsky, 2005, Tsujimoto & Shimizu, 2005). Der Transkriptionsregulator CpcB wurde ebenfalls in einigen Koinkubationsversuchen spenderunabhängig in *A. fumigatus* induziert (Tabelle 12/Abbildung 36). Die Zeitverlaufskurve für dieses Protein zeigt eine Erhöhung der Spotvolumens zum Zeitpunkt 60 Minuten. Das erhöhte Spotvolumen ändert sich auch nach 120 Minuten Koinkubation mit Granulozyten nicht. Erst nach 180 Minuten sinkt das „Level“ wieder auf Ausgangsniveau. Der CorA-Metallionentransporter war in fast allen Spendern nach Neutrophileninduktion hochreguliert (Tabelle 12). CorA Transporter sind am Transport von Magnesium und Kobalt beteiligt. Die Rolle dieses Proteins beim Schutz von *A. fumigatus* vor Immuneffektorzellen sollte weiter untersucht werden. Der Zeitverlauf der Spotinduktion während der Konfrontation mit neutrophilen Granulozyten lässt eine Funktion beim Schutz von *A. fumigatus* unter diesen Stressbedingungen ebenfalls erkennen (Abbildung 36). Um die Rolle dieser Proteine bei der Abwehr von Immuneffektorzellen und der Virulenz von *A. fumigatus* zu beweisen, sollten Deletionsmutanten der entsprechenden Gene erstellt und Infektionsversuche durchgeführt werden.

Diskussion

1. Oxidativer Stress in *A. fumigatus*.

1.1 Reaktionen von *A. fumigatus* auf ROI.

Die Produktion radikaler Sauerstoffintermediate (ROI) durch die NADPH Oxidase der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist für die Abwehr einiger Pathogene wie z.B. *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* und *Serratia marcescens* essentiell (Dinauer, 1993). Die Inaktivierung von Enzymen zur ROI Detoxifizierung führte in *C. neoformans* zu Makrophagen-suszeptiblen und in der Virulenz attenuierten Stämmen (Cox *et al.*, 2003, Missall *et al.*, 2004). Die Fähigkeit ROI zu detoxifizieren sollte demnach direkt mit der Virulenz des Pathogens korrelieren. Latgé postulierte, dass die Virulenz von *A. fumigatus* nicht auf einem essentiellen Virulenzfaktor basiert, sondern polygenen Ursprungs ist (Latgé, 1999). In dieser Arbeit wurde die Reaktion von *A. fumigatus* auf reaktive Sauerstoffintermediate untersucht, um die Bedeutung der oxidativen Stressantwort beim Schutz von *A. fumigatus* vor Immuneffektorzellen zu analysieren. Hierzu wurden zunächst die Reaktionen von *A. fumigatus* auf unterschiedliche oxidative Stressagentien am Beispiel der Thioredoxinreduktase untersucht. Es konnte durch Enzymaktivitätstests gezeigt werden, dass die Thioredoxinreduktase nach Zugabe von 2mM Diamid schnell und stark induziert wird, wohingegen 2mM H₂O₂ zu einer kurzzeitigen, pulsartigen Induktion der Aktivität führen. In *S. cerevisiae* induzierten diese Konzentrationen von oxidativen Agentien die oxidative Stressantwort (Delaunay *et al.*, 2002). Proteomanalysen des H₂O₂ gestressten *A. fumigatus* Wildtyps zeigten die Induktion der oxidativen und der generellen Stressantwort nach Zugabe von 2mM H₂O₂. Die Induktion der speziellen oxidativen Stressantwort wurde durch erhöhte Spotvolumina der Katalasen (Cat1, Cat2), der Superoxiddismutase (Sod1), der Thioredoxinperoxidase (AspF3) und des Peroxiredoxins (Prx1) in den 2D-Gelen detektiert. Da beide Peroxidasen vermutlich Thioredoxin als Kofaktor nutzen und ähnliche Funktionsweisen haben, wurde eine vergleichbare Induzierbarkeit nach H₂O₂ Behandlung erwartet. Die Peroxidasen AspF3 und Prx1 zeigten jedoch eine unterschiedlich schnelle Induktion nach H₂O₂ Zugabe in 2D-Gelen. Prx1 weist ein mitochondriales Signalpeptid auf, sodass das Protein vermutlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Da Antikörper gegen AspF3 in Aspergillosepatienten nachgewiesen wurden, wird das Protein sowohl cytoplasmatisch als auch auf der Zelloberfläche des Pilzes lokalisiert sein. Die Thioredoxinperoxidase TSA1 hat in *S. cerevisiae* sowohl Peroxidase als auch Chaperonfunktion. Die Expression des Thioredoxinperoxidasegens wird auch in *S. cerevisiae* unter oxidativem Stress induziert (Pocsi *et al.*, 2005). Die Deletion von *TSA1* führte in *S. cerevisiae* zur Inaktivierung mehrerer ROI detoxifizierender Proteine (Demasi *et al.*, 2006). Deshalb wurde der Thioredoxinperoxidase in *S. cerevisiae* neben der Funktion in der ROI Detoxifizierung auch eine Rolle bei der Regulation weiterer ROI Detoxifizierenden Proteine zugesprochen. Es ist

denkbar, dass das homologe Protein in *A. fumigatus* neben der Peroxidasefunktion vergleichbare, regulatorische Funktionen innehat.

Die Induktion der Katalasen Cat1 und Cat2 unter oxidativem Stress konnte in Proteomanalysen, Enzymaktivitätstests und „Northern blot“-Analysen in *A. fumigatus* verifiziert werden. Nachweislich sind die Katalasen nicht an der Virulenz von *A. fumigatus* beteiligt (Paris *et al.*, 2003b). Die Deletion der konidienspezifischen Katalase *catA* resultierte in einem ROI sensitiven *A. fumigatus* Stamm, der eine vergleichbare Überlebensrate bei Koinkubation mit Makrophagen im Vergleich zum Wildtypstamm aufwies (Paris *et al.*, 2003b).

In Proteomanalysen des *A. fumigatus* Wildtyps nach 45 Minuten Stressinduktion durch 2mM H_2O_2 wurde ausserdem eine Induktion der generellen Stressantwort durch erhöhte Spotvolumina der Hitzeschockproteine und der Spermidinsynthese detektiert. Spermidinsynthasen dienen in *S. cerevisiae* dem Schutz von DNA und Proteinen bei Stress. Die Deletion der Spermidinsynthase resultierte in *C. neoformans* in einer Reduktion der Kapselbildung, der Melaninproduktion und der Wachstumsrate (Kingsbury *et al.*, 2004). Eine Rolle der Spermidinsynthase in der pathogenen Entwicklung wird diskutiert.

Ausserdem wurden nach H_2O_2 Zugabe Proteine der Glykolyse, des Pentose Phosphatwegs und des Citratzyklus mit erhöhten Spotvolumina in den 2D-Gelen detektiert. Die Stressantwort ähnelt insgesamt der oxidativen Stressantwort von *C. albicans* und *S. cerevisiae* (Pocsi *et al.*, 2005, Kusch *et al.*, 2007). Allerdings wurde in *C. albicans* nach Zugabe von H_2O_2 die Induktion Glutathion-abhängiger Detoxifizierungsmechanismen (Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase) detektiert, was nach der Stressinduktion von *A. fumigatus* nicht beobachtet wurde. Das Thioredoxin-abhängige ROI Detoxifizierungssystem scheint in *A. fumigatus* wie in *A. nidulans* eine bedeutendere Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress zuzukommen (Thon *et al.*, 2007).

1.2 Regulation der oxidativen Stressantwort in *A. fumigatus* durch AfYap1.

Da die Regulation der oxidativen Stressantwort in *S. cerevisiae* über den Transkriptionsfaktor Yap1p gesteuert wird, wurde das entsprechende Homologe AfYap1 in *A. fumigatus* identifiziert und charakterisiert. Die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors AfYap1 konnte in *A. fumigatus* nach H_2O_2 , Menadion und Diamidbehandlung durch eine AfYap1-eGFP Fusion nachgewiesen werden. Die Akkumulation des AfYap1-eGFP Proteins im Kern basiert offensichtlich auf einem ähnlichen Mechanismus wie bei *S. cerevisiae*, da nach Reduktion des AfYap1 Moleküls durch Zugabe von DTT ein ausschliesslich cytoplasmatisches eGFP Signal beobachtet wurde. Die Gpx3 vermittelte Oxidation bestimmter Cysteinreste am C Terminus des Yap1 Proteins führt zur Ausbildung von Disulfidbrücken und damit zur Konformationsänderung des Moleküls in *S. cerevisiae*. Die Kernexportsequenz (NES) zwischen den Cysteinen kann daraufhin von dem Exportin Crm1 im oxidierten Yap1 Molekül nicht mehr erkannt werden und Yap1 sammelt sich im Kern (siehe auch Einleitung). Unterschiedliche Stressagentien resultieren hierbei in

Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Cysteinen im Yap1 Molekül, die offensichtlich die stress-spezifische, transkriptionelle Regulation bestimmter Zielgene ermöglicht. Durch diesen Mechanismus lässt sich u.a. die unterschiedlich starke Induktion der Thiothioninreduktase durch H_2O_2 und Diamid in *A. fumigatus* erklären.

Die in dieser Arbeit verwendeten oxidativen Agentien führten zu unterschiedlich starken Stressinduktionen, da sie eine unterschiedliche Stabilität und Reaktivität aufweisen. Die Stressinduktion mit 2mM H_2O_2 löste vermutlich kurzzeitigen oxidativen Stress aus, da H_2O_2 schnell durch Katalasen und Peroxidasen abgebaut wird. Nach Stressinduktion mit 2mM Menadion wurde ein länger persistierendes AfYap1-eGFP Signal im Kern detektiert, da Menadion in erster Linie Superoxidradikalanionen (O_2^-) freisetzt, die zuerst durch Superoxiddismutasen zu H_2O_2 umgesetzt werden. Das entstandene H_2O_2 wird wiederum durch Katalasen und Peroxidasen abgebaut. Die Zugabe von 2mM Diamid resultierte in einem über mehrere Stunden stabilen AfYap1-eGFP Kernsignal. Diamid führt in der Zelle zur Oxidation aller verfügbaren Cysteine und Thiolgruppen und dadurch auch zur Oxidation des AfYap1 Proteins. Diamid interagiert außerdem mit dem Glutathionredoxzyklus und verschiebt das Redoxgleichgewicht der Zelle in Richtung Oxidation (Kusch *et al.*, 2007). Das AfYap1-eGFP Protein lokalisierte deshalb unter Diamidstress im Kern. Die Diamid-Detoxifizierungsmechanismen sind jedoch nicht AfYap1 reguliert. Deshalb verbleibt AfYap1 unter Diamidstress im Kern. Dieser Umstand erklärt auch, warum *Afyap1*-Deletionsmutanten eine erhöhte Sensitivität gegen H_2O_2 , Menadion und tBOOH, aber nicht gegen Diamid zeigten. Das Yap1 Homologe in *A. nidulans* NapA verleiht gleichfalls Resistenz gegen H_2O_2 , Menadion und tBOOH aber nicht gegen Diamid. Die *napA* Deletionsmutante wuchs auf Cadmium, Hochsalz und Sorbitolmedium mit vergleichbarer Geschwindigkeit wie der Wildtyp (Asano *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass NapA in *A. nidulans* eine ähnliche Funktion bei der Regulation der oxidativen Stressantwort wie AfYap1 in *A. fumigatus* zukommt.

Bei einem proteomanalytischen Vergleich von H_2O_2 gestresstem Wildtyp mit dem *Afyap1* Deletionsstamm wurden sowohl erhöhte als auch verringerte Spotvolumina detektiert, was darauf schließen lässt, dass AfYap1 direkt und/oder indirekt als Repressor und Aktivator fungieren kann. Insgesamt wies das 2D-Gel des gestressten *Afyap1* Deletionsstammes verringerte Spotvolumina bei Proteinen der Hitzeschockantwort und der Transkriptions-/Translationsmaschinerie auf. AfYap1 führt vermutlich bei oxidativem Stress zur Aktivierung der entsprechenden Gene in *A. fumigatus*, eine Funktion, die bei der Deletion von *Afyap1* von keinem anderen Regulator übernommen wurde.

Das p-Nitroreduktasegen *pnr1* konnte in dieser Arbeit durch Proteom- und „Northern blot“-Analysen als eindeutiges AfYap1 Zielgen identifiziert werden. Beim proteomanalytischen Vergleich des gestressten Wildtyps mit der gestressten *Afyap1* Mutante wurde für den Pnr1 Proteinspot ein verringertes Spotvolumen unter oxidativem Stress detektiert. In der *Afyap1* Deletionsmutante konnte in den „Northern blot“-Analysen auch nach Stressinduktion durch

H₂O₂ oder Menadion kein *pnr1* Transkript nachgewiesen werden. p-Nitroreduktasen bilden eine grosse Gruppe konservierter, eukaryotischer Proteine, die an der Regulation des Redoxzustandes der Zelle bei oxidativem und nitrosativem Stress beteiligt sind (de Oliveira *et al.*, 2007). Da Pnr1 nur unter oxidativem nicht aber unter nitrosativem Stress in *A. fumigatus* induziert wurde, könnte Pnr1 als Markerprotein für oxidativen Stress bei Koinkubation mit Immuneffektorzellen oder in Infektionen genutzt werden.

Die Thioredoxin abhängigen Peroxidasen AspF3 und Prx1 wurden im 2D-Gel nach Stressinduktion durch 2mM H₂O₂ jeweils durch mehrere Proteinspots repräsentiert. Unterschiedliche posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung und Glykosylierung) führen zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes des Proteins und damit zu einer anderen Lokalisation des Spots im 2D-Gel. Die Deletion von *Afyap1* löste bei beiden Peroxidasen Veränderungen dieser Modifikationen aus und damit den „shift“ der Proteinspots auf einer horizontalen Ebene im Gel. Über die absolute Regulation der Peroxidasen durch AfYap1 lässt sich aufgrund dieser 2D Gele keine genaue Aussage treffen. In „Northern blot“-Analysen wurde allerdings eine verringerte Induktion der Expression von *aspF3* unter H₂O₂ und Menadionstress im *Afyap1*-Deletionsstamm beobachtet. Die stressabhängige Expression der Thioredoxinperoxidase *aspF3* wird demnach in *A. fumigatus* u.a. durch AfYap1 reguliert.

1.3 Der Einfluss von oxidativem Stress auf die Sekretion von Proteinen.

Bei der Proteomanalyse der sekretierten Proteine von *A. fumigatus* nach Diamidzugabe, wurden insgesamt relativ viele intrazelluläre Proteine im 2D-Gel von extrazellulären Proteinen detektiert, da vermutlich die 48 stündige Inkubation der Hyphen bereits zur Lyse der älteren Myzelbereiche geführt hatte. Die oxidative Stressantwort nach Diamidzugabe wurde durch erhöhte Spotvolumina der Katalasen und Superoxiddismutasen im 2D-Gel des Überstandes detektiert. Die *Afyap1*-Deletion hatte wenig Einfluss auf die Sekretion der Proteine unter Diamidstress, da der proteomanalytische Vergleich des Diamidgestressten Wildtyps mit der *Afyap1*-Mutante wenige Veränderungen der Spotvolumina der sekretierten Proteine zeigte. Da die Deletion des *Afyap1* Gens zu Veränderungen der oxidativen Stressantwort geführt hat, ist davon auszugehen, dass nur wenige durch AfYap1 regulierte Proteine bei oxidativem Stress sekretiert werden. Einzig bei der Sekretion der Katalase Cat2 und dem Hämolysin konnte ein klarer Einfluss der *Afyap1*-Deletion detektiert werden. Interessanterweise wurde der Spot der alkalischen Protease nach Diamidinduktion mit erhöhtem Spotvolumen im Überstand des Δ *Afyap1*-Stammes detektiert. Vermutlich verhindert AfYap1 die vermehrte Sekretion der Protease bei oxidativem Stress, um die frühe Induktion der Wirtsantwort zu umgehen. Die sekretierten Proteasen von *A. fumigatus* gehören im weitestens Sinne zu den Toxinen, die im Wirt allergische Reaktionen auslösen können (Fox *et al.*, 2004, Monod *et al.*, 2002). Proteasen werden in erster Linie von *A. fumigatus* während der Infektion sekretiert, um die zellulären Barrieren des Wirts aufzulösen (Latge, 1999).

1.4 Der Einfluss von AfSkn7 bei der Regulation der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus* in Kooperation mit AfYap1.

Der Transkriptionsfaktor Skn7p interagiert in *S. cerevisiae* mit Yap1p bei der Regulation ROI detoxifizierender Gene. Interessanterweise zeigt Skn7p Sequenzähnlichkeiten zum Hitzeschockprotein Hsf1 in *S. cerevisiae* (Wiederrecht *et al.*, 1988). Die Deletion der *skn7* Homologen in *C. albicans* und *C. neoformans* führte zur Reduktion der Virulenz und zur erhöhten ROI Sensitivität (Singh *et al.*, 2004, Wormley *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde das Skn7 Homologe in *A. fumigatus* identifiziert und charakterisiert. Die *Afskn7* Deletion führte zu einer erhöhten Sensitivität gegen H₂O₂ und tBOOH und zu einer erhöhten Resistenz gegen Menadion im Vergleich zum Wildtyp. Da Menadion die Freisetzung von Superoxidradikalanionen (O₂⁻) auslöst, die durch Superoxiddismutasen zu H₂O₂ umgesetzt werden, ist AfSkn7 vermutlich an der Repression der Expression der Superoxiddismutasegene beteiligt. In „Northern blot“-Analysen wurde eine leichte Induktion der Superoxiddismutasegene *sod1* und *sodB* im Wildtyp bei H₂O₂ und Menadionzugabe nachgewiesen. Die Stressinduktion von *sod1* und *sodB* war im *Afskn7* Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Interessanterweise war die *sod1* und *sodB* Expression auch im *Afyap1* Deletionsstamm bei Menadioninduktion im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls erhöht. Menadionstress führt offensichtlich bei AfYap1 zu einer Konformationsänderung, wodurch der Transkriptionsfaktor auf beide Superoxiddismutasegene als Repressor wirkt. Bei Stressinduktion durch H₂O₂ wurde dieser Effekt nicht detektiert. Es wurden bereits zwei Klassen von Superoxiddismutasen in *A. fumigatus* beschrieben die Mn Sod und die Cu/Zn Sod (Fluckiger *et al.*, 2002, Holdom *et al.*, 1996, Holdom *et al.*, 2000). Die Cu/Zn SOD liegt extrazellulär und an der Zellwand des Pilzes assoziiert vor (Holdom *et al.*, 2000). Die Deletion der *sod1* in *C. albicans* führte zur Reduktion der Virulenz (Hwang *et al.*, 2002). Viele Patienten mit invasiver Aspergillose enthalten Antikörper gegen die Superoxiddismutase von *A. fumigatus* im Blut, wodurch dieses Enzym als Markerprotein für *A. fumigatus* Infektionen genutzt werden kann. Die Rolle der Superoxiddismutasen in der Virulenz von *A. fumigatus* ist noch ungeklärt. Die Induktion der Superoxiddismutasen bei Deletion von *Afskn7* könnte den Ausfall der Katalasen kompensieren und die Zellen gegen Superoxidradikalanionen und damit gegen Menadion schützen. Die vermehrte Expression der Superoxiddismutasegene bei *Afskn7* Deletion könnte demnach für die erhöhte Resistenz gegen Menadion bei *A. fumigatus* mitverantwortlich sein.

Mit Menadion behandelte Hefezellen zeigten einen erhöhten intrazellulären Glutathionspiegel. Bei Menadionstress wird ein Menadion-Glutathion Konjugat gebildet, das aus der Zelle ausgeschleust wird, um dem Menadionstress zu entgehen. Bei Deletion des Glutathiongens wurde die Expression der Superoxiddismutasen unter Menadionstress induziert (Zadzinski *et al.*, 1998). Es ist daher wahrscheinlich, dass Menadion auch in *A. fumigatus* zur Induktion der glutathionabhängigen Detoxifizierungsgene führt. Eine Rolle von

AfSkn7 bei der Regulation der Expression dieser Gene in *A. fumigatus* ist nach den vorliegenden Versuchsergebnissen wahrscheinlich.

Die ROI abhängige Induktion der Expression des Katalasegens *cat1* sowie der Superoxiddismutasegene *sod1* und *sodB* unterlag demzufolge AfYap1 und AfSkn7. Da allerdings eine Deletion beider Transkriptionsfaktoren zu keinem Ausfall der Expression dieser Gene führte, sind noch andere Faktoren an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt. In *A. nidulans* unterliegt die Kontrolle der Expression des Cu/Zn Superoxiddismutasegens dem Transkriptionsfaktor SreA, der auch die Siderophorbiosynthese reguliert. Die Siderophorbiosynthese ist in *A. fumigatus* essentiell für die Virulenz (Oberegger *et al.*, 2000, Schrettl *et al.*, 2004, Schrettl *et al.*, 2007). Die Induktion der Expression einiger ROI detoxifizierender Proteine wurde in *A. fumigatus* unter Eisen-limitierenden Bedingungen d.h. bei Aktivierung der Siderophorbiosynthese detektiert (Schrettl *et al.*, 2007). Es ist denkbar, dass die Expression der Superoxiddismutasen in *A. fumigatus* neben AfSkn7 und AfYap1 ebenfalls durch SreA reguliert ist.

Obwohl die Induktion der Thioredoxinreduktase nach Zugabe von 2mM H₂O₂ oder Diamid in Enzymaktivitätstests gezeigt wurde, konnte der Thioredoxinreduktase-Proteinspot nicht in den Proteomanalysen der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus* identifiziert werden. Dies könnte in 2D-Gelen problematisch sein, da es sich bei dem Enzym um ein 42 kDa grosses Protein mit einem pI von 5,1 handelt. Der Gelbereich in einem 24cm Gel mit einem pH Gradienten von 3-11, in dem sich Proteine mit diesen Eigenschaften befinden, ist mit vielen Proteinspots besetzt. Bei einer weiteren Auftrennung dieses pH Bereichs durch die Verwendung von IPG „strips“ mit einem pH Gradienten von 4-7 auf 24 cm könnte die Thioredoxinreduktase in den 2D-Gelen möglicherweise identifiziert werden.

Die Expression des Thioredoxinreduktasegens ist in *C. neoformans* Skn7 abhängig (Wormley *et al.*, 2005). Die Deletion von *Afskn7* könnte bei gleichem Einfluss von AfSkn7 auf die Thioredoxinreduktase in *A. fumigatus* somit zur Kernlokalisation von AfYap1 führen, da Thioredoxin für die Reduktion des Yap1p Proteins verantwortlich ist. Bei Ausfall der Thioredoxinreduktase wurde permanente Yap1p Kernlokalisation in *S. cerevisiae* beobachtet (Carmel-Harel *et al.*, 2001). Dieser regulatorische Einfluss von AfSkn7 auf die Thioredoxinreduktase und damit auf AfYap1 könnte auch die erhöhte Expression von *pnr1* ohne Stressinduktion im $\Delta Afskn7$ Stamm in *A. fumigatus* erklären, die in „Northern blot“-Analysen beobachtet wurde. Bei der Sequenzanalyse des Promotors des Thioredoxinreduktasegens wurde eine putative AfSkn7- und eine AfYap1-Bindestelle detektiert. Die Regulation der Expression der Thioredoxinreduktase durch AfSkn7 und AfYap1 und damit ein Einfluss der *Afskn7* Deletion auf die Expression der Thioredoxinreduktase ist demzufolge wahrscheinlich.

In *S. cerevisiae* ist Skn7 ein „Response regulator“ des Proteins Sln1, das über den Hog1 Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Li *et al.*, 1998). Die Deletion des Hog1 Homologen

sakA und des Sln1 Homologen *tcsB* in *A. fumigatus* zeigten, dass *Afskn7* nicht über diesen Signaltransduktionsweg reguliert wird. Eine *sakA* Mutante war zwar sensitiv gegen Menadion und H₂O₂, zeigte aber keine Veränderung der *Afskn7* oder *tcsB* Expression (Du *et al.*, 2006). Die Aktivierung von AfSkn7 unterliegt demnach in *A. fumigatus* anderen Mechanismen als in *S. cerevisiae* und ist nicht Hog1 abhängig.

Promotoranalysen, in denen nach putativen AfYap1- und AfSkn7-Bindestellen gesucht wurde zeigten, dass AfSkn7 neben seinen Zielgenen zur ROI Detoxifizierung vermutlich auch seine eigene Expression reguliert. Es konnte weiterhin belegt werden, dass der Promotor des Glutathiongens eine putative AfYap1 Bindestelle aufweist. Die Promotoren des Glutathionperoxidasegens und des Cytochrom C Peroxidasegens wiesen mehrere AfSkn7 Bindestellen auf. Die Glutathion-abhängige ROI Detoxifizierung scheint in *A. fumigatus* daher AfYap1 und AfSkn7 abhängig zu sein, wobei vermutlich wegen der grossen Häufigkeit der AfSkn7 Bindestellen hier AfSkn7 ein grösserer Einfluss zukommt. Die alleinige Regulation der Katalaseaktivität Cat2 und der p-Nitroreduktase Pnr1 durch AfYap1 konnte in Proteomanalysen, Enzymassays und „Northern blot“-Analysen nachgewiesen werden. In den Promotorsequenzen beider Gene (*cat2* und *pnr1*) wurden mehrere putative AfYap1 Bindestellen detektiert. Es ist daher wahrscheinlich, dass die identifizierten Konsensussequenzen in den Promotoren dieser Gene die Bindung von AfYap1 vermitteln.

Insgesamt wurden bei den Sequenzanalysen der Promotoren von ROI Detoxifizierungsgenen vermehrt AfYap1 Bindestellen in Promotoren von Genen des Thioredoxin-abhängigen Detoxifizierungsmechanismus (Thioredoxinperoxidase AspF3, Peroxiredoxin Prx1, Thioredoxinreduktase Trr1) detektiert. Promotoren von Genen Glutathion-abhängiger Detoxifizierungsmechanismen (Glutathionperoxidase Gpx3, Cytochrome C Peroxidase Ccp1) wiesen dagegen vermehrt AfSkn7 Bindestellen auf. Vorausgesetzt die Bindestellen sind funktional und die Konsensussequenzen der Transkriptionsfaktoren sind auf einen anderen Organismus übertragbar, vermittelt AfSkn7 bei oxidativem Stress die Induktion der Expression des Gens des „Redoxtransducers“ Gpx3, der die Oxidation am AfYap1 Molekül vollzieht. Auch die Anwesenheit einer putativen AfSkn7 Bindestelle im *Afyap1* Promotor lässt vermuten, dass AfSkn7 Einfluss auf die AfYap1 Aktivität hat.

Wie bereits erwähnt resultierte die Deletion des *skn7* Gens in *S. cerevisiae* in einer höheren Induktion der Thioredoxinperoxidase TSA1, Thioredoxin TRX2 und Glutathion GSH2 unter Menadionstress im Vergleich zum gestressten Wildtyp (Raitt *et al.*, 2000). Skn7 könnte in *S. cerevisiae* daher an der Repression dieser Gene beteiligt sein (Pocsi *et al.*, 2005, Raitt *et al.*, 2000). Die Expression des Thioredoxinperoxidasegens *tsa1* ist nachweislich in *C. albicans* durch das Yap1 Homologe Cap1 reguliert (Urban *et al.*, 2005). Die Promotoren der Thioredoxinperoxidasegene *aspF3* und *prx1* wiesen in *A. fumigatus* mehrere putative AfYap1 Bindestellen aber keine AfSkn7 Bindestelle auf. Die *Afskn7* Deletion führte jedoch zur reduzierten Expression des Thioredoxinperoxidasegens *aspF3* unter Menadion und H₂O₂ Stress. Da der Induktionsverlauf nach Stressinduktion trotz reduzierter Expressionslevel im

Afyap1 und *Afskn7* Deletionsstamm erhalten blieb, sind neben AfYap1 und AfSkn7 noch andere Faktoren an der stressabhängigen Regulation von *aspF3* beteiligt.

Interessanterweise zeigte die Katalase *cat1* eine AfYap1 abhängige Expression in „Northern blot“-Analysen und eine AfYap1 abhängige Erhöhung des Proteinspotvolumens unter oxidativem Stress, obwohl ihr Promotor keine putative Yap1 Bindestelle enthält. Es ist denkbar, dass noch andere Transkriptionsfaktoren mit AfYap1 und AfSkn7 einen Komplex bilden, der die Expression von Genen reguliert, ohne spezifische Yap1 oder Skn7 Bindestellen in den Promotoren dieser Gene zu benötigen. Die spezifische Konformationsänderung von Yap1 bei Oxidation durch unterschiedliche Stressagentien reguliert dabei die Bindungsaffinität zu den anderen Faktoren des Komplexes (Gulshan *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* wurde die stressabhängige Bindung von Yap1p zu dem Mediatorprotein Rox3p nachgewiesen. Rox3p bindet nach Yap1p Bindung an TATA Boxen in Promotoren der Zielgene (Gulshan *et al.*, 2005). Für Skn7p wurden schon Proteininteraktionen mit Yap1p (Morgan *et al.*, 1997), Hsf1 (Raitt *et al.*, 2000), Mbd1 (Bouquin *et al.*, 1999) und dem „Calcium response“ Faktor Crz1 (Williams & Cyert, 2001) in *S. cerevisiae* beschrieben. Die Beteiligung der Thioredoxinperoxidase TSA1 an einem Regulatorkomplex wurde in *S. cerevisiae* bereits diskutiert (Demasi *et al.*, 2006). Eine Komplexbildung zur stressabhängigen Regulation der Zielgene ist nach den Versuchsergebnissen dieser Arbeit auch in *A. fumigatus* sehr wahrscheinlich.

1.5 Der Einfluss von AfSkn7 und AfYap1 auf den Schutz von *A. fumigatus* gegen Fungizide.

Die Deletionsstämme dieser Arbeit wurden auf ihre Sensitivität gegen Imidazol, Amphotericin B und „Congo red“ getestet, da diese Fungizide mit der Sensitivität von *A. fumigatus* gegen oxidativen Stress und zellwandinterkalierenden Agentien im Zusammenhang stehen. Die pilzliche Zellwand besteht aus einem Grundgerüst aus β (1-3)-Glucaneinheiten, welches durch Galactomannan und Chitin verstärkt wird (Yuen *et al.*, 2001). Das Gen *fks1* ist zur β Glucansynthese und für das Wachstum von *A. fumigatus* essentiell (Ishibashi *et al.*, 2004). Echinocandine werden in der heutigen Medizin gegen Pizinfektionen eingesetzt, da sie die Glucansynthese und damit das Wachstum vieler filamentöser, humanpathogener Pilze inhibieren.

Amphotericin B zerstört die Membranpermeabilität der Zelle und führt so zum Tod. Die oxidativen Enzyme der Zelloberfläche gehen bei diesem Prozess auf bisher ungeklärte Weise verloren (Ellis, 2002). Der *Afyap1*-Deletionsstamm zeigte eine leicht erhöhte Sensitivität gegen Amphotericin B im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletion von *Afskn7* hatte eine leichte Erhöhung der Resistenz gegen Amphotericin B zur Folge. Die gleichzeitige Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* resultierte dagegen in einem resistenteren Stamm gegen Amphotericin B im Vergleich mit dem Wildtyp. Die AfYap1 Zielgene tragen offensichtlich zur Resistenz

gegen geringe Konzentrationen Amphotericin B bei, weshalb eine Deletion von *Afyap1* die Sensitivität erhöht. Die *AfSkn7* Zielgene hingegen sind zumindest formal an der Sensitivität der Zellwand von *A. fumigatus* gegen Amphotericin B beteiligt, da die *Afskn7* Deletion zu einem resistenteren Stamm im Vergleich zum Wildtyp führte. Im Allgemeinen geht eine Amphotericin B Resistenz auf eine Verringerung der Ergosterolkonzentration in der Membran und auf eine Veränderung der Membranlipide zurück. Das Fungizid kann die veränderte Zellmembran weniger gut binden und schädigen (Ellis, 2002). Expressionsanalysen mit *C. albicans* nach Exposition mit Amphotericin B zeigten eine Induktion verschiedener Ionentransporter und der oxidativen Stressantwort durch erhöhte Glutathion-, Katalase- und Superoxiddismutasespiegel (Liu *et al.*, 2005). Die erhöhte Sensitivität des Δ *Afyap1* Stammes gegen Amphotericin B könnte demnach eine Folge des Ausfalls der Katalasen in diesem Deletionsstamm sein. Auch die konstitutiv erhöhte Expression der Superoxiddismutasegene im Δ *Afskn7* Deletionsstamm könnte zu der erhöhten Resistenz gegen Amphotericin B beitragen. In *C. albicans* konnte nach Amphotericin B Behandlung eine Induktion der Expression des Flavohämoglobins nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005). Ein Test des von M. Vödisch erzeugten Δ *fhp1* Stammes (M. Vödisch, persönliche Mitteilung) auf die Sensitivität gegen Amphotericin B könnte Aufschluss über die Rolle des Flavohämoproteins in *A. fumigatus* geben.

Ein weiterer interessanter Nebeneffekt bei der Behandlung von *A. fumigatus* Infektionen mit Amphotericin B ist die Induktion der Gliotoxinproduktion des Pilzes durch dieses Fungizid (Reeves *et al.*, 2004). Gliotoxin wird von *A. fumigatus* während der Infektion sekretiert. Vermutlich reichen allerdings die produzierten Konzentrationen an Gliotoxin nicht aus, um die Zusammensetzung des NADPH Oxidasekomplexes zu hemmen (Kupfahl *et al.*, 2006, Tsunawaki *et al.*, 2004). Der Effekt der Gliotoxininduktion durch Amphotericin B Behandlung ist deshalb fraglich.

Der Effekt von „Congo Red“ auf die Zellwand von *A. fumigatus* ist noch unklar. Das „Congo Red“ Molekül interagiert mit den β (1,3)-Glucanuntereinheiten der Zellwand und stört so deren Aufbau. Die Deletion von *Afyap1* hatte keinen Effekt auf die „Congo Red“ Sensitivität. Die *Afskn7* Deletion resultierte im Wildtyp und Δ *Afyap1* Stamm in einer erhöhten Resistenz gegen „Congo Red“. Aus diesen Beobachtungen lässt sich eine Rolle von *AfSkn7* für die Zellwandintegrität in *A. fumigatus* vermuten. Auch in *S. cerevisiae* spielt *Skn7* eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität (He & Fassler, 2005).

1.6 Mauseinfektionen mit *A. fumigatus* Wildtyp, $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$.

Bei der Infektion von neutropenischen Mäusen zeigte der $\Delta Afyap1$ -Stamm, der $\Delta Afskn7$ -Stamm und der $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ -Stamm die gleiche Infektionsrate wie der Wildtyp und der $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstamm. Die Behandlung der Mäuse mit Cortisonacetat und Cyclophosphamid führt zu einer generellen Retardierung und Abschwächung aller Immuneffektorzellen. Neutrophile Granulozyten neutropenischer Mäuse produzieren kein signifikanten „oxidative burst“ in Infektionen.

Bei vorläufigen Infektionsversuchen von Mäusen, die nur mit Cortisonacetat immunsupprimiert und mit dem *Afyap1*- oder *Afskn7*-Deletionsstamm infiziert wurden, wurde eine Attenuation der Virulenz beobachtet, wenn die Infektionsrate des $\Delta Afyap1$ -Komplementationsstammes dem ursprünglichen Wildtyp gleichgesetzt wird. In diesen Infektionsversuchen zeigte die Infektion der Mäuse mit dem *A. fumigatus* Wildtypstamm aus bisher unbekannten Gründen keine Virulenz (vorläufige Daten nicht gezeigt). Die Behandlung der Mäuse mit Cortisonacetat führt zur Retardierung und Abschwächung der Aktivität alveolarer Makrophagen, hat jedoch nur wenig Einfluss auf die Immunkompetenz der neutrophilen Granulozyten, so dass hier durchaus Unterschiede im Virulenzverhalten abhängig vom verwendeten Mauseinfektionsmodell denkbar sind. Da es sich hierbei um vorläufige Ergebnisse handelt und bei der Infektion mit dem Wildtypstamm keine Virulenz beobachtet wurde, muss jedoch der Einfluss der Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* auf die Virulenz von *A. fumigatus* im Cortisonacetat-Modell in weiteren Versuchen verifiziert werden.

1.7 Die Rolle von ROI und RNI bei der Abwehr von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen.

Im Verlauf der *A. fumigatus* Infektion werden die Konidien in der Lunge durch Alveolar-Makrophagen attackiert, die sie phagozytieren und abtöten. Die Fähigkeit der Makrophagen Konidien abzutöten korreliert direkt mit der Infektionshäufigkeit der Patienten (Jahn *et al.*, 2002). In den Makrophagen kommt es bei Pathogenerkennung und nach der Phagozytose zur Induktion des „oxidative burst“, d.h. zur Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (Babior, 2002). Ausserdem sind Makrophagen mit Hilfe der NO-Synthase in der Lage Stickstoffradikale zu produzieren, die sich mit den ROI der NADPH Oxidase zu Peroxynitrit verbinden (Aguirre *et al.*, 2006). Makrophagen mit einem Defekt der NADPH Oxidase konnten keine *A. fumigatus* Konidien mehr abtöten (Philippe *et al.*, 2003). Der Einfluss von ROI auf das Abtöten von Konidien durch Makrophagen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da die Zugabe von Glutathion die Sterberate der Konidien bei Inkubation mit Makrophagen reduzierte. Die Zugabe des NO-Synthase Inhibitors L-NAME hatte dagegen keinen Effekt auf das „killing“ der Konidien durch Makrophagen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Hypothese, dass die NADPH Oxidase essentiell für das Abtöten von Konidien durch Makrophagen ist (Philippe *et al.*, 2003). $\Delta iNOS$ Makrophagen mit einem Defekt der

NO-Synthase töten *A. fumigatus* Konidien wie ungeschädigte Makrophagen ab (Philippe *et al.*, 2003). Es ist daher anzunehmen, dass NO Radikale beim „killing“ von Konidien durch Makrophagen keine bedeutende Rolle in *A. fumigatus* Infektionen zukommt. Trotz des Einflusses von Glutathion auf die Abtötungsrate der Konidien durch Makrophagen wurden die gegen ROI sensitiven Deletionsstämme $\Delta Afyap1$, $\Delta Afskn7$ und $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ ebenso schnell durch Makrophagen abgetötet wie der Wildtyp. Es ist daher anzunehmen, dass die von den Makrophagen gebildeten ROI nicht am Abtötungsprozess selbst sondern an sekundären Signaltransduktionswegen beteiligt sind, die zum Tod der Koniden führen (siehe unten).

1.8 Die Rolle des „oxidative burst“ bei der Abwehr von *A. fumigatus* durch neutrophile Granulozyten.

Obwohl neutrophile Granulozyten von CGD Patienten durch einen Defekt der NADPH Oxidase keinen „oxidative burst“ induzieren können, sind diese Zellen noch in der Lage, *A. fumigatus* Konidien am Auskeimen zu hindern (Bonnett *et al.*, 2006). Der Überstand einer CGD Zelllinie enthielt eine hohe Konzentration an Lactoferrin und Granulaproteinen, die das Wachstum der Konidien inhibierten. Da die Zugabe von Eisen zum Überstand den inhibitorischen Effekt auf Konidien aufhob, scheint die hohe Lactoferrinkonzentration für diesen Effekt verantwortlich zu sein (Zarembek *et al.*, 2007). Bei Konfrontationsversuchen von gesunden Granulozyten und *A. fumigatus* Konidien wurde beobachtet, dass Konidien generell weniger „oxidative burst“ induzieren als Hyphen (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe des Cytochrom C Reduktionstests wurde in dieser Arbeit die Induktion des „oxidative burst“ der Granulozyten durch Hyphen aller *A. fumigatus* Deletionsstämme detektiert. Die Abtötungsrate der Hyphen durch Granulozyten war bei Wildtyp und $\Delta Afyap1$ Hyphen in Koinkubationsversuchen gleich, da die $\Delta Afyap1$ Hyphen gleich gut erkannt und abgetötet wurden wie Hyphen des Wildtypstammes. Da $\Delta Afyap1$ Hyphen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität gegen ROI zeigten, ist anzunehmen, dass ROI bei dem Abtöten der Hyphen durch Granulozyten keine bedeutende Rolle zukommt. Ergänzend kommt hinzu, dass die Zugabe von Glutathion oder des NADPH Oxidase Hemmstoffs DPI keinen Einfluss auf die Abtötungsrate im „Konfrontationsassay“ von neutrophilen Granulozyten mit *A. fumigatus* Hyphen hatte. Man sollte bei der Behandlung der Zellen mit DPI bedenken, dass nicht nur die NADPH Oxidase sondern auch die NADH Dehydrogenase des Atmungskomplexes I der Mitochondrien gehemmt wird und die Zellen vermutlich eine verkürzte Lebensdauer haben (Cheng *et al.*, 2006). Vor den Koinkubationsversuchen wurde daher sichergestellt, dass die verwendete DPI Konzentration nicht toxisch auf die Granulozyten wirkte (Daten nicht gezeigt). Die verwendete Konzentration an DPI reichte aus, um den „oxidative burst“ der Granulozyten zu verhindern (Reistad *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte der Einfluss von ROI beim „killing“ von *C. albicans* durch Granulozyten nach Zugabe von Glutathion und DPI nachgewiesen werden (Mezger *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang werden alternative Signaltransduktionswege zur

Aktivierung des „oxidative burst“ in neutrophilen Granulozyten diskutiert, da der inhibitorische Effekt von Glutathion und DPI nur bei PMA (Phorbolmyristat) stimulierten neutrophilen Granulozyten beobachtet wurde. Ohne Vorstimulation mit PMA wurden die *C. albicans* Hyphen ebenfalls bis zu einer Überlebensrate von 50% abgetötet, die Zugabe von Glutathion und DPI hatte jedoch keinen Effekt (Wozniok *et al.*, 2008). Da in dem Konfrontationsassay von *A. fumigatus* Hyphen mit PMA vorstimulierten, neutrophilen Granulozyten die Zugabe von Glutathion und DPI keinen Effekt auf die Überlebensrate der Pilze hatte, scheinen ROI weder beim Abtöten von *A. fumigatus* Hyphen durch neutrophile Granulozyten noch bei der Aktivierung anderer Abwehrmechanismen eine wichtige Rolle zu spielen.

Granulozyten produzieren bei Pathogenerkennung nicht nur ROI sondern auch NO Radikale und Defensine. Ausserdem sind sie in der Lage, „nuclear extracellular traps“ (NETs) zu bilden, um Pathogene für das Immunsystem zu markieren und sie zu schädigen. Der NETs Bildung geht eine selbstinduzierte Lyse voraus, wonach das Pathogen mit DNA-Protein Fäden aus dem geplatzten Neutrophilen „markiert“ wird. Die an den DNA Strängen gebundenen Proteine (Histone und Granulaproteine) haben Proteasefunktion. Ausserdem aktivieren frei vorliegende, wirtseigene Proteine weitere Immuneffektorzellen (Urban *et al.*, 2006a, 2006b, Hirsch, 1958). Der Einfluss der NADPH Oxidase auf die NETs Bildung konnte mit Granulozyten aus CGD Patienten und Granulozyten nach Zugabe von DPI gezeigt werden (Brinkmann *et al.*, 2004). Voraussetzung für die NETs Bildung ist demnach die Induktion des „oxidative burst“ (Urban *et al.*, 2006b). Granulozyten von CGD Mäusen fehlt die Fähigkeit, NETs bei Pathogenerkennung auszubilden. NETs Bildung konnte bei Granulozyten aus CGD Patienten auch nicht durch den NADPH Oxidase Aktivator Phorbolmyristat (PMA) induziert werden. Die Zugabe von H₂O₂ induzierte bei diesen Granulozyten NETs Bildung (Urban *et al.*, 2006b). NETs Bildung konnte bei *A. fumigatus* während der Kernlokalisationsstudien von AfYap1 bei Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Koinkubationsversuchen mit gesunden, neutrophilen Granulozyten und *A. fumigatus* Hyphen wurden die Granulozyten mit PMA vorstimuliert. Es ist daher anzunehmen, dass PMA zur Induktion des „oxidative burst“ und der NETs Bildung geführt hat. Da der „oxidative burst“ bei den Konfrontationsexperimenten von *A. fumigatus* und neutrophilen Granulozyten durch die Zugabe von DPI oder Glutathion verhindert wurde und die Hyphen trotzdem abgetötet wurden, können NETs nicht massgeblich an der Abwehr von *A. fumigatus* Hyphen beteiligt sein. Der inhibitorische Einfluss von DPI auf die NETs Bildung bei PMA stimulierten PMNs wurde in Infektionsstudien mit *Staphylococcus aureus* bereits gezeigt (Fuchs *et al.*, 2007).

Die Beobachtung, dass Katalasen auf der Oberfläche von Pathogenen vor „oxidative burst“ und NETs Bildung schützen (Fuchs *et al.*, 2007) und der Δ Afyap1-Stamm ebenso durch Granulozyten abgetötet wurde wie der Wildtyp, obwohl dem Deletionsstamm nachweislich

die Katalasen fehlen, macht die Rolle von NETs in der Abwehr von *A. fumigatus* zusätzlich unwahrscheinlich.

1.9 Proteomanalyse der Stressantwort von *A. fumigatus* nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten.

Um die Abwehr von *A. fumigatus* gegen neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurden Proteomanalysen von Hyphen durchgeführt, die mit neutrophilen Granulozyten aus gesunden Spendern koinkubiert wurden. Bereits 60 Minuten nach Beginn der Koinkubation waren die Hyphen mit Granulozyten konjugiert. Es ist anzunehmen, dass die Antwort des Pilzes auf PMNs daher relativ zeitnah nach Zugabe der neutrophilen Granulozyten in 2D-Gelen nachzuweisen ist. Die Konfrontationsversuche wurden mit neutrophilen Granulozyten aus fünf verschiedenen Spendern durchgeführt, um die Variabilität der Fitness der Zellen statistisch auszugleichen. Obwohl Neutrophile und Hyphen in immer gleichen Zahlenverhältnissen (1:10) miteinander koinkubiert wurden, variierte die Stressinduktionszeit zwischen den Versuchsreplikaten erheblich. Im Folgenden werden deshalb nur Proteine diskutiert, die in mehreren Versuchsreplikaten veränderte Spotvolumina aufwiesen.

Bei Koinkubation mit Hyphen des *otef-Afyap1-eGFP* Stammes zeigte sich auch bei langer Inkubationszeit keine Kernakkumulation von AfYap1, was auf eine geringe ROI Produktion der PMNs unter diesen Bedingungen hindeutet. Trotzdem wurde die oxidative Stressantwort in Form erhöhter Spotvolumina der Thioredoxinperoxidase AspF3 und des Peroxiredoxins Prx1 nach der Koinkubation mit PMNs in *A. fumigatus* detektiert. Interessanterweise zeigte die Superoxiddismutase Mn Sod ein verringertes Spotvolumen nach 180 Minuten Stressinduktion durch PMNs. Es ist daher anzunehmen, dass bei der Konfrontation von neutrophilen Granulozyten mit *A. fumigatus* weniger Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$) als Peroxidradikale (O_2^{2-}) gebildet werden.

Des Weiteren wurden nach Zugabe von PMNs Erhöhungen der Proteinspotvolumina von Enzymen des Glyoxylatzyklus detektiert. Die Induktion des Glyoxylatzyklus weist auf die Verstoffwechselung von C2-Kohlenstoffquellen (z.B. Acetat aus dem Lipidabbau) hin. Die Stilllegung des Glyoxylatzyklus durch die Deletion der Isocitratlyase führte in *C. neoformans* zur Virulenzattenuation (Lorenz & Fink, 2001). In *A. fumigatus* hatte die Deletion der Isocitratlyase keinen Effekt auf die Virulenz (Schöbel *et al.*, 2007). Trotzdem scheint dieser Stoffwechselweg bei der Konfrontation mit neutrophilen Granulozyten in *A. fumigatus* aktiviert zu werden. Es kann sich hierbei auch nicht um einen Effekt durch die Inkubation in RPMI Medium handeln, da das Myzel zur Isolation der Referenzproteinextrakte der 2D-Gelanalyse ebenfalls in RPMI angezogen wurde.

Die Induktion der Enolase AspF22 nach Koinkubation mit Granulozyten konnte ebenfalls in 2D-Gelen nachgewiesen werden. Die Enolase ist in *A. fumigatus* am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt. Das Homolog der Enolase in *C. albicans* konnte erfolgreich als immuninduktives Agens bei *C. albicans* Infektionen nachgewiesen werden (Denikus *et al.*, 2005). Auch wenn der Enolase von *A. fumigatus* ein Sekretionssignal fehlt,

wurde sie bereits extrazellulär auf der Zelloberfläche nachgewiesen und wird dort vermutlich direkt vom Immunsystem des Wirtes erkannt (Lai *et al.*, 2002, Denikus *et al.*, 2005). Es ist denkbar, dass die gesteigerte Produktion von Enolase AspF22 in *A. fumigatus* bei Granulozytenkontakt die Erkennung der Pilzhypen durch die Immunzellen noch verstärkt.

Nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten zeigte das CpcB Protein aus *A. fumigatus* in mehreren Versuchen ein erhöhtes Spotvolumen. Der CPC („Cross pathway control“) Signalweg ist in filamentösen Pilzen ein hoch konservierter Mechanismus für die Wahrnehmung und Reaktion auf Aminosäuremangel (Hinnebusch, 1986, Hoffmann *et al.*, 2001).

Durch Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 an der alpha Untereinheit mittels der Sensor Kinase CpcC wird die allgemeine Translation von Genen bei Aminosäuremangel reprimiert. Der zu Gcn4p homologe Transkriptionsfaktor CpcA hingegen zeigt in *A. fumigatus* unter diesen Bedingungen ein erhöhtes Transkriptionslevel, wodurch dessen Zielgene auf transkriptioneller Ebene induziert werden. Die Deletion von *cpcA* führte in *A. fumigatus* zur Attenuation der Virulenz (Krappmann *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass der CPC-Signalweg in *A. fumigatus* Konidien nicht aktiviert wird, wenn sie von Makrophagen phagozytiert wurden, da dort kein Aminosäuremangel vorliegt (Krappmann *et al.*, 2004). Bei Koinkubation von *C. albicans* und Granulozyten wurde die Induktion des CPC-Wegs nach Transkriptomanalyse gezeigt (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003). Die Deletion des CpcA Homologen GCN4 führte in *C. albicans* zu keiner attenuierten Virulenz (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). Da es sich bei CpcB um einen Inhibitor von *cpcA* in *A. fumigatus* handelt, ist anzunehmen, dass auch bei der Koinkubation mit Granulozyten kein Aminosäuremangel von den *A. fumigatus* Hyphen wahrgenommen wird (Sasse *et al.*, 2008). Neben CpcB zeigte auch der Translationsinitiationsfaktor eIF5A erhöhtes Spotvolumen nach Koinkubation mit Granulozyten. Inwiefern dieser Translationsinitiationsfaktor an der CPC Regulation beteiligt ist, bleibt unklar. Das erhöhte Spotvolumen lässt keine Aussage bezüglich der Aktivität und Modifikationen des Faktors zu, weshalb aufgrund der Induktion von CpcB eine Inhibition von *cpcA* nur spekulativ ist.

Der CorA Metallionentransporter zeigte nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten aus fast allen Spendern erhöhtes Spotvolumen in den 2D-Gelanalysen. CorA Transporter sind am Transport von Magnesium und Kobalt in *S. cerevisiae* beteiligt (Payandeh & Pai, 2006). Aus der Deletion des *corA* Gens in *Salmonella enterica* resultierte die Reduktion der Virulenz, obwohl ein weiterer Mg^{2+} Transporter die Funktion übernehmen konnte und kein Mg^{2+} Mangel in den Zellen detektiert wurde (Maguire, 2006). Da die Induktion des CorA Mg^{2+} Transporters mehrfach in den Koinkubationsversuchen mit Granulozyten in *A. fumigatus* detektiert wurde, könnte CorA direkt an der Antwort des Pilzes auf die Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten beteiligt sein. Die Rolle des Transporters in der Virulenz filamentöser Pilze ist bisher ungeklärt und bedarf näheren Untersuchungen.

Auch die Lactoyl-Glutathionlyase (Lgl1) wurde nach Granulozytenstress mit erhöhtem Spotvolumen in 2 D-Gelen detektiert. Sie ist an der Detoxifizierung des toxischen Methylglyoxals beteiligt, das während verschiedener Stoffwechselprozesse als Nebenprodukt entsteht (Thornalley, 2003). Das Enzym wird als Medikamententarget gegen Krebs und einige Parasiten diskutiert und ist durch S-(N-hydroxy-N-methylcarbamoyl)-Glutathion inhibierbar (Cameron *et al.*, 1999). Die Deletion des *lg11* Gens in *Streptococcus* resultierte in einem „sauren pH sensitiven“ Phänotyp. Die Rolle der Lgl1 während der Karriesbildung wird in *Streptococcus* diskutiert (Korithoski *et al.*, 2007). Die Induktion der Lactoyl-Glutathionlyase nach Granulozyten-Stressinduktion lässt vermuten, dass das Enzym auch an der Virulenz oder an der Biofilmbildung von *A. fumigatus* beteiligt ist.

Neben dem viel diskutierten pathogenabtötenden Potential des „oxidative burst“ der neutrophilen Granulozyten könnten jedoch auch sekundäre Effekte an der Pathogenabwehr beteiligt sein. Es wurde nachgewiesen, dass Neutrophile in CGD Patienten noch geringe Mengen an ROI produzieren können (Segal *et al.*, 2000, Dinayer *et al.*, 2000). Es ist denkbar, dass diese ROI Konzentrationen ausreichen, um eine Botenstofffunktion in den PMNs auszuführen. Die Granula der Neutrophilen enthalten eine Vielzahl von Chitinasen und Proteasen, die an der Zellwand von Hyphen binden und zur Permeabilität führen (Latge, 1999). Die sekretierten kationischen Peptide und Defensine haben ebenfalls ein hohes fungizides Potential (Okamoto *et al.*, 2004). Obwohl Superoxidradikalanionen O_2^- eine antimikrobielle Wirkung aufweisen, wird die Rolle des Radikals in der Pathogenabwehr bezweifelt. Indem die NADPH Oxidase Elektronen auf Sauerstoff überträgt, werden auch Protonen vom Cytosol ins Phagolysosom transportiert, was zur Ansäuerung führt (Henderson & Meech, 2002). Der KaliumEinstrom induziert durch die NADPH Oxidase führt ausserdem zur Aktivierung der Proteasen Elastase und Cathepsin G (Henderson & Meech, 2002). Die NADPH Oxidase hat also weniger die Aufgabe, ROI zu produzieren als vielmehr den K^+ Einstrom und damit die Proteaseaktivierung zu gewährleisten. Geringe Konzentrationen an ROI führen zudem zur Aktivierung von Metalloproteasen in Granulozyten (Reeves *et al.*, 2002, Ahluwalia *et al.*, 2004). Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass Mäuse mit defekter Serinprotease und intakter NADPH Oxidase ebenso susceptibel für Pilzinfektionen sind wie $Nox^{-/-}$ Mäuse (Henderson & Meech, 2002). Deshalb sollte den Proteasen ein wichtigerer Stellenwert in der Virulenz von *A. fumigatus* zugewiesen werden.

2. Nitrosativer Stress in *A. fumigatus*.

2.1 Analyse der nitrosativen Stressantwort von *A. fumigatus*.

Die Produktion reaktiver Stickstoffradikale durch die „Nitric oxide synthase“ (iNOS) ist wie die NADPH Oxidase durch die Cytokine INF γ , TNF α , IL1 und 2 reguliert (Fang, 1997). Es ist daher anzunehmen, dass beide Radikalformen gleichzeitig in infiziertem Gewebe vorliegen. Eine Infektion ist mit einem Anstieg der NO Konzentration im Gewebe korreliert (Evans *et al.*, 1993). In Meningitis Patienten wurde eine erhöhte Expression des iNOS Gens (*nos2*) in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (Winkler *et al.*, 2001). Interessanterweise wiesen Patienten mit chronischer Granulomatose (CGD) ebenfalls eine permanent erhöhte *nos2* Expression in diesen Immuneffektorzellen auf (Condino-Neto *et al.*, 1993). Bei Induktion der iNOS wurden Konzentrationen von bis zu 4 μ M NO in Gewebezellen nachgewiesen. In uninfizierten Zellen lag die NO-Konzentration bei 0,1 μ M (Lirk *et al.*, 2002). Die Deletion der iNOS in Mäusen führte zur Hypersuszeptibilität gegen viele Bakterienstämme. Die Zugabe von iNOS Inhibitoren hatte demzufolge den gleichen Effekt (Akaike & Maeda, 2000). Auch beim Ausfall der NADPH Oxidase kann es zur Verbindung von NO und O $_2^-$ Radikalen zu Peroxinitrit kommen, da die Xanthin-Oxidase des Wirts die Produktion geringer Mengen ROI gewährleistet (Swain *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass NO-Radikale die Katalasen vieler Organismen hemmen, wodurch der Abbau von ROI verzögert und die Synthese von Peroxinitrit begünstigt wird (Kim *et al.*, 1995). NO Radikale scheinen demnach eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr des Wirtes zu spielen. Ebenso wichtig sind folglich die NO-Detoxifizierungsmechanismen der Pathogene, die eine erfolgreiche Besiedelung des Wirtes anstreben.

Die Antwort auf reaktive Stickstoffradikale (RNI) wurde in *A. fumigatus* durch die Zugabe von DETA NO untersucht. Um die NO Stress induzierende Konzentration von DETA NO für *A. fumigatus* zu ermitteln, wurden Expressionsstudien des Flavohämoglobin-Denitrosylase Homologen und des Nitrosoglutathionreduktase Homologen aus *C. neoformans* analysiert. Beide Proteine sind zur Detoxifizierung von NO Radikalen und für die Virulenz von *C. neoformans* essentiell (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Die Expression beider Gene wurde durch die Zugabe von 2,5 mM DETA NO in *A. fumigatus* induziert. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Nitrosoglutathionreduktase Gsn1 und die Flavohämoglobin-Denitrosylase Fhb1 auch in *A. fumigatus* an der Detoxifizierung von NO Radikalen beteiligt sind. Interessanterweise wurde nach Zugabe von DETA NO eine Repression der Expression des Thioredoxinperoxidasegens *aspF3* und des Flavohämoпротеingens *fhp1* in „Northern blot“-Analysen beobachtet. Die Regulation der Expression dieser Gene in *A. fumigatus* unter NO Stress ist bisher noch unklar. Nach DETA NO Zugabe wurde allerdings eine Spotvolumenzunahme der Thioredoxinperoxidase im 2D-Gel detektiert. Es ist denkbar, dass die erhöhte Proteinkonzentration von AspF3 die Expression von *aspF3* in einer „feedback“-Schleife reprimiert. Die Deletion der Thioredoxinperoxidase reduzierte die Virulenz von *C.*

neoformans im Mausinfektionsmodell (Missall *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass die Thioredoxinperoxidase in *A. fumigatus* an der ROI und der NO Detoxifizierung beteiligt ist. Neben der reduzierten Expression des *fhp1* Gens unter NO-Stress wurde auch für den Proteinspot des Flavohämoproteins unter diesen Bedingungen ein verringertes Spotvolumen in der Proteomanalyse der NO Stressantwort detektiert. Die Deletion des *fhp1* Gens in *A. fumigatus* führte jedoch zu einer NO sensitiven Mutante. Die Wirkungsweise des Flavohämoglobins in der NO-Stressantwort von *A. fumigatus* bedarf weiterer Experimente. Infektionsstudien und Koinkubationsversuche mit Immuneffektorzellen des *fhp1*-Deletionsstammes im Vergleich zum *A. fumigatus* Wildtypstamm sollten Aufschluss über die Rolle des Proteins in der Infektion geben.

RNI führten in *A. fumigatus* generell zur Aktivierung der oxidativen Stressantwort in Form erhöhter Spotvolumina der Katalasen, Superoxiddismutasen und Peroxidasen in 2D-Gelen nach DETA NO Zugabe. Es wurde gezeigt, dass Superoxiddismutasen gegen ROI und RNI schützen, da die Detoxifizierung von H_2O_2 die Produktion von Peroxinitrit verringert (Dubourdeau *et al.*, 2006). NO-Radikale inhibieren viele Enzyme zur ROI Detoxifizierung in *S. cerevisiae* z.B. Glutathionperoxidasen, Superoxiddismutasen und Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenasen, was die Induktion der Expression dieser Gene unter NO Stress in *A. fumigatus* erklärt (Fujii & Yamagata, 2000). In Proteomanalysen des DETA NO gestressten *A. fumigatus* Wildtyps wurde eine Erhöhung der Spotvolumina der Proteasen und Peptidasen detektiert. Proteasen werden in der Regel von Pathogenen sekretiert oder sind an der Zellwand assoziiert, um während der Infektion Nährstoffe aus der Umgebung zu akquirieren oder das Eindringen der Pilzhypen in das Gewebe des Wirts zu erleichtern (siehe oben). Zudem wird ihre Rolle in der Virulenz diskutiert (Lee & Kolattukudy, 1995). Ihre Induktion nach Zugabe von DETA NO ist ein Hinweis auf die Rolle von NO Radikalen bei der Infektion von *A. fumigatus*.

Die Zugabe von DETA NO führte in *A. fumigatus* ausserdem zur Spotvolumenzunahme der Malat Dehydrogenase, der Triosephosphat Isomerase, einer Alkohol Dehydrogenase und der Pyruvat Decarboxylase, was auf eine Modifizierung des Energiemetabolismus und der Bereitstellung von NADPH und ATP schliessen lässt. Interessanterweise benötigt die Pyruvat Decarboxylase als Kofaktor Thiamin-Pyrophosphat. Die Thiaminbiosynthese wurde ebenfalls durch ROI und NO Radikale induziert. Vitamine (Thiamin) schützen die Zelle aber auch generell gegen ROI und RNI vermittelte Zellschäden, da sie „scavenger“ Funktion ausüben (Jamieson, 1998).

Proteinspots der Ubiquitylierungsmaschinerie zeigten unter NO Stress ebenfalls erhöhte Spotvolumina. Die Anwesenheit von NO Radikalen führt zur Bildung von Peroxinitrit. Peroxinitrit kann Modifizierungen an Proteinen herbeiführen, die Ubiquitylierung vortäuschen, was zum Abbau des Proteins führt (Lirk *et al.*, 2002). Aufgrund der Proteomdaten ist es wahrscheinlich, dass 2,5mM DETA NO bereits zur Bildung von Peroxinitrit ausreichen und es zu Proteinmodifizierungen kommt, die zur Proteindegradation führen.

Auch der Proteinspot des Hitzeschockproteins Hsp1 zeigte nach DETA NO Zugabe eine Erhöhung des Spotvolumens. Hsp1 wurde in *A. fumigatus* Infektionen als Allergen identifiziert (AspF12) und ist mit der Virulenz des Pilzes assoziiert (Rementeria *et al.*, 2005, Pratt *et al.*, 2004). Die Deletion von *Afyap1* und *Afskn7* hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität von *A. fumigatus* gegen DETA NO auf Agarplatten. AfYap1 und AfSkn7 sind demnach nicht an der NO Stressantwort beteiligt. Es ist denkbar, dass das Hitzeschockprotein Hsp1 mit seiner Chaperonfunktion die NO Stressantwort von *A. fumigatus* moduliert und so eine Rolle in der Virulenz von *A. fumigatus* spielt.

2.2 Die Rolle von NO Radikalen bei der Abwehr von *A. fumigatus* durch Immuneffektorzellen.

In Koinkubationsexperimenten mit Makrophagen und *A. fumigatus* Konidien hatte die Zugabe des iNOS Inhibitors L-NAME keinen Einfluss auf die Sterberate der Konidien (siehe oben). NO-Radikale sind demnach nicht an der Abwehr von *A. fumigatus* Konidien durch Makrophagen beteiligt.

Bei der Koinkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit Granulozyten ist der Effekt der Zugabe von L-NAME auf die Abtötungsrate des Pilzes fraglich. Bei neun Versuchswiederholungen konnte für die Zugabe von L-NAME in fünf Versuchen eine Reduktion der Abtötungsrate der *A. fumigatus* Hyphen beobachtet werden. Die Inhalation von L-NAME vor der Infektion mit *C. albicans* reduzierte die Infektionsrate von Mäusen dramatisch (Nagata *et al.*, 2003, Ohsugi *et al.*, 2007). Eine Rolle von NO-Radikalen bei der Abwehr von *C. albicans* Infektionen wird daher diskutiert. Die spezielle NO Stressantwort durch das Flavohämoglobin Fhb1 und die Nitrosoglutathionreduktase Gsno1 wurde in Proteomanalysen von *A. fumigatus* Hyphen nach Koinkubation mit neutrophilen Granulozyten jedoch nicht detektiert. Interessanterweise bindet Nitrosoglutathion auch an der Glutathionreduktase und hemmt sie dadurch kompetitiv (Lirk *et al.*, 2002). Eine Induktion der Nitrosoglutathionreduktase hätte demnach die Detoxifizierung von Nitrosoglutathion zur Folge, wodurch die Glutathionreduktase wieder aktiviert würde. Die Expression des Glutathionreduktasegens *glr1* war kurzzeitig und parallel zur Expression des Nitrosoglutathionreduktasegens *gsno1* nach DETA NO Zugabe induziert. Der inhibitorische Einfluss einer hohen Nitrosoglutathionkonzentration auf die Aktivität der Glutathionreduktase ist nach den vorliegenden Versuchsergebnissen auch in *A. fumigatus* denkbar. In *C. neoformans* waren die Expression des Thioredoxinperoxidasegens und des Glutathionreduktasegens nach NO Stress induziert (Missall & Lodge, 2005). Eine Deletion des Glutathionreduktasegens führte zu einem NO hypersensitiven, avirulenten *C. neoformans* Stamm (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Die Beteiligung der Glutathionreduktase von *A. fumigatus* an der Detoxifizierung von NO Radikalen ist ebenfalls denkbar.

Um die Rolle von NO Radikalen bei der Abwehr von Immuneffektorzellen und bei der Infektion durch *A. fumigatus* weiter aufzuklären, wäre es möglich, die NO-Konzentration in infizierten Geweben mit Hilfe eines sensitiven Nitrit-assays nachzuweisen (Lane *et al.*, 1994). Geringe NO Konzentrationen können auch mit Hilfe des „Gries-Reagenz“ bei einer

Wellenlänge von 543nm im Photometer bestimmt werden (Green *et al.*, 1982). Auf der anderen Seite sollten schon Expressionsstudien des NO-Synthasegens *nos2* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *A. fumigatus* Infektion Aufschluss über die Produktion von NO-Radikalen geben. So könnte auch die Rolle von NO Radikalen während der Koinkubation von *A. fumigatus* Hyphen mit Granulozyten untersucht werden. Infektionsversuche mit *nox1*^{-/-} und *nos2*^{-/-} Mausstämmen mit *Pneumocystis* zeigten die gleiche Infektionsrate wie Wildtypmausstämmen (Swain *et al.*, 2004). Folglich variiert die Rolle der NADPH Oxidase und der NO Synthase bei der Infektion unterschiedlicher Pathogene und muss für jedes Pathogen spezifisch bestimmt werden.

Literaturverzeichnis:

Aguirre J, Hansberg W, Navarro R (2006) Fungal responses to reactive oxygen species. *Med Mycol* 44 Suppl: 101-107.

Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, Segal AW (2004) The large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel is essential for innate immunity. *Nature* 427(6977): 853-858.

Akaike T, Maeda H (2000) Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101(3): 300-308.

Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, Koyama H (2002) Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 40(6): 557-563.

Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T, Mizuno T (2007) Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(7): 1800-1803.

Austin B, Hall RM, Tyler BM (1990) Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* 93(1): 157-162.

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52(3): 741-744.

Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5): 1464-1476.

Babior BM (2002) The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J* 4(11): 1023-1024.

Balloy V, Si-Tahar M, Takeuchi O, Philippe B, Nahori MA, Tanguy M, Huerre M, Akira S, Latge JP, Chignard M (2005) Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 73(9): 5420-5425.

Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB (2006) Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun* 74(12): 6528-6539.

Borregaard N, Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10): 3503-3521.

Bouquin N, Johnson AL, Morgan BA, Johnston LH (1999) Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* 10(10): 3389-3400.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brakhage AA, Langfelder K (2002) Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* 56: 433-455.

Brakhage AA (2005) Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr Drug Targets* 6(8): 875-886.

Brakhage AA, Liebmann B (2005) *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Med Mycol* 43(Suppl 1): 75-82.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663): 1532-1535.

- Brombacher K, Fischer BB, Rufenacht K, Eggen RI** (2006) The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast* 23(10): 741-750.
- Brown JL, North S, Bussey H** (1993) SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* 175(21): 6908-6915.
- Cameron AD, Ridderstrom M, Olin B, Kavarana MJ, Creighton DJ, Mannervik B** (1999) Reaction mechanism of glyoxalase I explored by an X-ray crystallographic analysis of the human enzyme in complex with a transition state analogue. *Biochemistry* 38(41): 13480-13490.
- Carlyon JA, Chan WT, Galan J, Roos D, Fikrig E** (2002) Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation. *J Immunol* 169(12): 7009-7018.
- Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown PO, Storz G** (2001) Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 39(3): 595-605.
- Chauhan N, Latge JP, Calderone R** (2006) Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* 4(6): 435-444.
- Cheng W, Shen J, Wu D, Li X, Lan Y, Li F, Huang S, Zhang H, Gong Y** (2006) Electronic origin for enhanced nonlinear optical response of complexes from tetraalkylammonium halide and carbon tetrabromide: electrostatic potentials of intermolecular donor-acceptor dyads. *Chemistry* 12(26): 6880-6887.
- Condino-Neto A, Muscara MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MM, De Nucci G** (1993) Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol* 35(5): 485-490.
- Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, Perfect JR** (2003) Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun* 71(1): 173-180.
- Crameri R** (1999) Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. *Contrib Microbiol* 2: 44-56.
- da Silva Ferreira ME, Kress MR, Savoldi M, Goldman MH, Hartl A, Heinekamp T, Brakhage AA, Goldman GH** (2006) The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 5(1): 207-211.
- Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM** (2007) A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *Embo J* 26(23): 4801-4811.
- de Jesus-Berrios M, Liu L, Nussbaum JC, Cox GM, Stamler JS, Heitman J** (2003) Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr Biol* 13(22): 1963-1968.
- de Oliveira IM, Henriques JA, Bonatto D** (2007) In silico identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 355(4): 919-925.
- del Palacio A, Cuetara MS, Ponton J** (2003) Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 20(3): 90-98.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB** (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111(4): 471-481.
- Demasi AP, Pereira GA, Netto LE** (2006) Yeast oxidative stress response. Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *Febs J* 273(4): 805-816.

- Denikus N, Orfaniotou F, Wulf G, Lehmann PF, Monod M, Reichard U** (2005) Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. *Infect Immun* 73(8): 4704-4713.
- Diamond RD, Krzesicki R, Epstein B, Jao W** (1978) Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes *in vitro*. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol* 91(2): 313-328.
- Diamond RD, Clark RA** (1982) Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils *in vitro*. *Infect Immun* 38(2): 487-495.
- Dinauer MC** (1993) Leukocyte function and nonmalignant leukocyte disorders. *Curr Opin Pediatr* 5(1): 80-87.
- Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC** (2000) Inherited neutrophil disorders: Molecular basis and new therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 303-318.
- Du C, Sarfati J, Latge JP, Calderone R** (2006) The role of the *sakA* (Hog1) and *tcsB* (*sln1*) genes in the oxidant adaptation of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 44(3): 211-218.
- Dubourdeau M, Athman R, Balloy V, Huerre M, Chignard M, Philpott DJ, Latge JP, Ibrahim-Granet O** (2006a) *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol* 177(6): 3994-4001.
- Dubourdeau M, Athman R, Balloy V, Philippe B, Sengmanivong L, Chignard M, Philpott DJ, Latge JP, Ibrahim-Granet O** (2006b) Interaction of *Aspergillus fumigatus* with the alveolar macrophage. *Med Mycol* 44 Suppl: 213-217.
- Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, Xie Q, Riley LW** (1997) A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186(11): 1885-1896.
- Ellis D** (2002) Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 49(Suppl 1): 7-10.
- Evans TG, Thai L, Granger DL, Hibbs JB, Jr.** (1993) Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol* 151(2): 907-915.
- Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J** (1996) Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9553-9558.
- Fan CY, Lee S, Cyr DM** (2003) Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 8(4): 309-316.
- Fang FC** (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 99(12): 2818-2825.
- Fluckiger S, Mittl PR, Scapozza L, Fijten H, Folkers G, Grutter MG, Blaser K, Crameri R** (2002) Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-A resolution. *J Immunol* 168(3): 1267-1272.
- Fox M, Gray G, Kavanagh K, Lewis C, Doyle S** (2004) Detection of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins: immunogen synthesis and immunoassay development. *J Microbiol Methods* 56(2): 221-230.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A** (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176(2): 231-241.
- Fujii S, Yamagata Y** (2000) Structural bases for substrate recognition and repair system of base-excision DNA repair proteins. *Nucleic Acids Symp Ser* 44: 57-58.

- Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C** (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3(2): 536-545.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO** (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11(12): 4241-4257.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J** (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(35): 22480-22489.
- Goldberg I, Hochman A** (1989) Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta* 991(2): 330-336.
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ** (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12): 3665-3685.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR** (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-138.
- Gritz L, Davies J** (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25(2-3): 179-188.
- Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST, Moye-Rowley WS** (2005) Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem* 280(49): 40524-40533.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 136: 557-580.
- Harshman KD, Moye-Rowley WS, Parker CS** (1988) Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* 53(2): 321-330.
- He XJ, Fassler JS** (2005) Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 58(5): 1454-1467.
- Henderson LM, Meech RW** (2002) Proton conduction through gp91phox. *J Gen Physiol* 120(6): 759-765.
- Hinnebusch AG** (1986) Multiple levels of gene regulation in the control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioessays* 5(2): 57-62.
- Hirsch JG** (1958) Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 108(6): 925-944.
- Hoffmann B, Valerius O, Andermann M, Braus GH** (2001) Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene *cpcA* of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 12(9): 2846-2857.
- Holdom MD, Hay RJ, Hamilton AJ** (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun* 64(8): 3326-3332.
- Holdom MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ, Monod M** (2000) Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol* 38(2): 558-562.
- Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD** (2005) Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Mol Biol Cell* 16(10): 4814-4826.

- Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO** (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148(Pt 11): 3705-3713.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H** (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14(8 Suppl 3): S227-232.
- Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Ohno N** (2004) The solubilization and biological activities of *Aspergillus* beta-(1-3)-glucan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42(2): 155-166.
- Izawa S, Maeda K, Sugiyama K, Mano J, Inoue Y, Kimura A** (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274(40): 28459-28465.
- Jahn B, Langfelder K, Schneider U, Schindel C, Brakhage AA** (2002) PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* 4(12): 793-803.
- Jamieson DJ** (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(16): 1511-1527.
- Jiang H, English AM** (2006) Phenotypic analysis of the *ccp1*Delta and *ccp1*Delta-*ccp1*W191F mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* indicates that cytochrome c peroxidase functions in oxidative-stress signaling. *J Inorg Biochem* 100(12): 1996-2008.
- Kim YM, Bergonia HA, Muller C, Pitt BR, Watkins WD, Lancaster JR, Jr.** (1995) Nitric oxide and intracellular heme. *Adv Pharmacol* 34: 277-291.
- Kingsbury JM, Yang Z, Ganous TM, Cox GM, McCusker JH** (2004) Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3(3): 752-763.
- Klose J** (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26(3): 231-243.
- Klose J, Kobalz U** (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16(6): 1034-1059.
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA** (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 49(3): 178-189.
- Korithoski B, Levesque CM, Cvitkovitch DG** (2007) Involvement of the detoxifying enzyme lactoylglutathione lyase in *Streptococcus mutans* aciduricity. *J Bacteriol* 189(21): 7586-7592.
- Krappmann S, Bignell EM, Reichard U, Rogers T, Haynes K, Braus GH** (2004) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA contributes significantly to the virulence of this fungal pathogen. *Mol Microbiol* 52(3): 785-799.
- Kuge S, Jones N** (1994) YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *Embo J* 13(3): 655-664.
- Kuge S, Jones N, Nomoto A** (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16(7): 1710-1720.
- Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A** (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21(18): 6139-6150.

- Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, Ruppert T, Härtl A, Hof H, Brakhage AA** (2006) Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Mol Microbiol* 62(1):292-302.
- Kusch H, Engelmann S, Albrecht D, Morschhauser J, Hecker M** (2007) Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics* 7(5): 686-697.
- Lai HY, Tam MF, Tang RB, Chou H, Chang CY, Tsai JJ, Shen HD** (2002) cDNA cloning and immunological characterization of a newly identified enolase allergen from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus*. *Int Arch Allergy Immunol* 127(3): 181-190.
- Lamarre C, LeMay JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y** (2001) *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem* 276(47): 43784-43791.
- Lambeth JD** (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4(3): 181-189.
- Lane TE, Wu-Hsieh BA, Howard DH** (1994) Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 62(5): 1940-1945.
- Langfelder K, Jahn B, Gehringer H, Schmidt A, Wanner G, Brakhage AA** (1998) Identification of a polyketide synthase gene (*pkpP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med Microbiol Immunol* 187(2): 79-89.
- Langfelder K, Philippe B, Jahn B, Latge JP, Brakhage AA** (2001) Differential expression of the *Aspergillus fumigatus* *pkpP* gene detected *in vitro* and *in vivo* with green fluorescent protein. *Infect Immun* 69(10): 6411-6418.
- Latge JP** (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12(2): 310-350
- Latge JP** (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 9(8): 382-389.
- Lau DT, Kasper JD, Potter DE, Lyles A** (2004a) Potentially inappropriate medication prescriptions among elderly nursing home residents: their scope and associated resident and facility characteristics. *Health Serv Res* 39(5): 1257-1276.
- Lau GH, MacGillivray RT, Murphy ME** (2004b) Characterization of a nucleotide-binding domain associated with neisserial iron transport. *J Bacteriol* 186(10): 3266-3269.
- Lee JD, Kolattukudy PE** (1995) Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. *Infect Immun* 63(10): 3796-3803.
- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB** (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274(23): 16040-16046.
- Lee WL, Harrison RE, Grinstein S** (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5(14): 1299-1306.
- Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA** (2007) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell* 6(12): 2290-2302.
- Lev S, Hadar R, Amedeo P, Baker SE, Yoder OC, Horwitz BA** (2005) Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryot Cell* 4(2): 443-454.

- Levitz SM, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI, Diamond RD** (1986) *In vitro* killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis* 154(3): 483-489.
- Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ, Fassler JS** (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo J* 17(23): 6952-6962.
- Li S, Dean S, Li Z, Horecka J, Deschenes RJ, Fassler JS** (2002) The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p. *Mol Biol Cell* 13(2): 412-424.
- Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I** (2005) Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 280(23): 21763-21772.
- Liebmann B, Muhleisen TW, Muller M, Hecht M, Weidner G, Braun A, Brock M, Brakhage AA** (2004a) Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. *Arch Microbiol* 181(5): 378-383.
- Liebmann B, Muller M, Braun A, Brakhage AA** (2004b) The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 72(9): 5193-5203.
- Ligr M, Velten I, Frohlich E, Madeo F, Ledig M, Frohlich KU, Wolf DH, Hilt W** (2001) The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 12(8): 2422-2432.
- Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM** (2001) Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* 32(3): 358-366.
- Lirk P, Hoffmann G, Rieder J** (2002) Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1(1): 89-108.
- Liu TT, Lee RE, Barker KS, Wei L, Homayouni R, Rogers PD** (2005) Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6): 2226-2236.
- Lorenz MC, Fink GR** (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412(6842): 83-86.
- Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F** (2007) Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 9(2): 368-381.
- Maguire ME** (2006) Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Front Biosci* 11: 3149-3163.
- Malicev E, Chowdhury HH, Macek P, Sepcic K** (2007) Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis. *Med Mycol* 45(2): 123-130.
- McElhaney-Feser GE, Rauli RE, Cihlar RL** (1998) Synergy of nitric oxide and azoles against *Candida* species *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 42(9): 2342-2346.
- Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD** (1995) A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *J Infect Dis* 172(4): 1153-1156.

- Mezger M, Wozniok I, Blockhaus C, Kurzai O, Hebart H, Einsele H, Loeffler J** (2008) Impact of Mycophenolic Acid on the Functionality of Human Polymorphonuclear Neutrophils and Dendritic Cells during Interaction with *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr 21.
- Missall TA, Pusateri ME, Lodge JK** (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 51(5): 1447-1458.
- Missall TA, Lodge JK** (2005) Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Mol Microbiol* 57(3): 847-858.
- Missall TA, Pusateri ME, Donlin MJ, Chambers KT, Corbett JA, Lodge JK** (2006) Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell* 5(3): 518-529.
- Molina L, Kahmann R** (2007) An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19(7): 2293-2309.
- Monje-Casas F, Michan C, Pueyo C** (2004) Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth. *Biochem J* 383(Pt 1): 139-147.
- Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O** (2002) Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 292(5-6): 405-419.
- Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S, Johnston LH** (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16(5): 1035-1044.
- Moye-Rowley WS** (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2(3): 381-389.
- Müller P, Aichinger C, Feldbrügge M, Kahmann R** (2000) The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 34(5): 1007-1017.
- Nagata K, Iwasaki Y, Takemura Y, Harada H, Yokomura I, Fushiki S, Nakagawa M** (2003) Effect of inhaled NG-nitro-L-arginine methyl ester on *Candida*-induced acute lung injury. *Chest* 124(6): 2293-2301.
- Nandakumar MP, Shen J, Raman B, Marten MR** (2003) Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* 2(1): 89-93.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6): 255-262.
- Nguyen DT, Alarco AM, Raymond M** (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* 276(2): 1138-1145.
- Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL** (1996) Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 183(5): 2293-2302.
- Nierman WC, May G, Kim HS, Anderson MJ, Chen D, Denning DW** (2005) What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med Mycol* 43(Suppl 1): S3-5.
- O'Farrell PH** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250(10): 4007-4021.

- Oberegger H, Zadra I, Schoeser M, Haas H** (2000) Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS Lett* 485(2-3): 113-116.
- Ohsugi S, Iwasaki Y, Takemura Y, Nagata K, Harada H, Yokomura I, Hosogi S, Yuba T, Niisato N, Miyazaki H, Matsubara H, Fushiki S, Marunaka Y** (2007) An inhaled inducible nitric oxide synthase inhibitor reduces damage of *Candida*-induced acute lung injury. *Biomed Res* 28(2): 91-99.
- Okamoto T, Tanida T, Wei B, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T** (2004) Regulation of fungal infection by a combination of amphotericin B and peptide 2, a lactoferrin peptide that activates neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(6): 1111-1119.
- Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latge JP, Denning DW, Dyer PS** (2005) Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* 15(13): 1242-1248.
- Paris S, Debeaupuis JP, Cramer R, Carey M, Charles F, Prevost MC, Schmitt C, Philippe B, Latge JP** (2003a) Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1581-1588.
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP** (2003b) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 71(6): 3551-3562.
- Payandeh J, Pai EF** (2006) A structural basis for Mg^{2+} homeostasis and the CorA translocation cycle. *Embo J* 25(16): 3762-3773.
- Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, Gougerot-Pocidalo MA, Sanchez Perez M, Van der Meer A, Latge JP** (2003) Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun* 71(6): 3034-3042.
- Pocsi I, Miskei M, Karanyi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade RA** (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H_2O_2 and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures -linking genome- wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* 6: 182.
- Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB** (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16(8): 857-872.
- Rabilloud T** (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 17(5): 813-829.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J** (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18(3-4): 307-316.
- Rabilloud T** (1998) Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19(5): 758-760.
- Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH** (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 *in vivo* and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11(7): 2335-2347
- Ram AF, Klis FM** (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* 1(5): 2253-2256.
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW** (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature* 416(6878): 291-297.
- Reeves EP, Murphy T, Daly P, Kavanagh K** (2004) Amphotericin B enhances the synthesis and release of the immunosuppressive agent gliotoxin from the pulmonary pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 53(Pt 8): 719-725.

- Reistad T, Mariussen E, Fonnum F** (2005) The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol Sci* 83(1): 89-100.
- Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, Garaizar J** (2005) Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 22(1): 1-23.
- Roos D, van Bruggen R, Meischl C** (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5(14): 1307-1315.
- Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR** (2003) Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 11007-11012.
- Ruchel R, Reichard U** (1999) Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. *Contrib Microbiol* 2: 21-43.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sasse C, Bignell EM, Hasenberg M, Haynes K, Gunzer M, Braus GH, Krappmann S** (2008) Basal expression of the *Aspergillus fumigatus* transcriptional activator CpcA is sufficient to support pulmonary aspergillosis. *Fungal Genet Biol* 45(5): 693-704.
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst HN, Jr., Haynes K, Haas H** (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* 200(9): 1213-1219.
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, Wallner A, Arst HN, Jr., Haynes K, Haas H** (2007) Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog* 3(9): 1195-1207.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM** (2000) Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 79(3): 170-200.
- Serrano-Gomez D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL** (2004) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 173(9): 5635-5643.
- Shibuya K, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, Latge JP** (2006) Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47(4): 249-255.
- Singh P, Chauhan N, Ghosh A, Dixon F, Calderone R** (2004) Skn7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* 72(4): 2390-2394.
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Schöbel F, Ibrahim-Granet O, Avé P, Latgé JP, Brakhage AA, Brock M** (2007) *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive aspergillosis. *Infect Immun*. 75(3):1237-44.
- Spellig T, Bottin A, Kahmann R** (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 252(5): 503-509.
- Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, Komanduri KV** (2005) *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* 105(6): 2258-2265.

- Stephens-Romero SD, Mednick AJ, Feldmesser M** (2005) The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun* 73(1): 114-125.
- Swain SD, Wright TW, Degel PM, Gigliotti F, Harmsen AG** (2004) Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis pneumonia* in mice. *Infect Immun* 72(10): 5722-5732.
- Thau N, Monod M, Crestani B, Rolland C, Tronchin G, Latge JP, Paris S** (1994) Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 62(10): 4380-4388.
- Thon M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, Brakhage AA** (2007) The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem* 282(37): 27259-27269.
- Thornalley PJ** (2003) Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1343-1348.
- Tsujimoto Y, Shimizu S** (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 12(Suppl 2): 1528-1534.
- Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T** (2004) Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun* 72(6): 3373-3382.
- Tsuzi D, Maeta K, Takatsume Y, Izawa S, Inoue Y** (2004) Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett* 565(1-3): 148-154.
- Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S** (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 57(5): 1318-1341.
- Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A** (2006a) How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* 8(11): 1687-1696.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A** (2006b) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8(4): 668-676.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E** (1996) Peroxynitrite contributes to the candidicidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect Immun* 64(8): 3127-3133.
- Vogt RN, Steenkamp DJ, Zheng R, Blanchard JS** (2003) The metabolism of nitrosothiols in the *Mycobacteria*: identification and characterization of S-nitrosomycothiols reductase. *Biochem J* 374(Pt 3): 657-666.
- Wiederrecht G, Seto D, Parker CS** (1988) Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54(6): 841-853.
- Williams KE, Cyert MS** (2001) The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *Embo J* 20(13): 3473-3483.
- Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW** (2001) Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis* 183(12): 1749-1759.
- Wormley FL, Jr., Heinrich G, Miller JL, Perfect JR, Cox GM** (2005) Identification and characterization of an *SKN7* homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 73(8): 5022-5030.
- Wozniak I, Hornbach A, Schmitt C, Frosch M, Einsele H, Hube B, Löffler J, Kurzai O** (2008) Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol* 10(3): 807-820.

Wu AL, Moye-Rowley WS (1994) GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 14(9): 5832-5839.

Yan C, Lee LH, Davis LI (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J* 17(24): 7416-7429.

Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21(17): 3666-3672.

Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12(Suppl 2): 1542-1552.

Yuen KY, Chan CM, Chan KM, Woo PC, Che XY, Leung AS, Cao L (2001) Characterization of AFMP1: a novel target for serodiagnosis of aspergillosis. *J Clin Microbiol* 39(11): 3830-3837.

Zadzinski R, Fortuniak A, Bilinski T, Grey M, Bartosz G (1998) Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem Mol Biol Int* 44(4): 747-759.

Zarembek KA, Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Gallin JI (2007) Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol* 178(10): 6367-6373.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Lessing F, Kniemeyer O, Jacobsen I, Brakhage AA. Characterisation of the $\Delta Afyap1/\Delta Afskn7$ double deletion in *Aspergillus fumigatus*, in Vorbereitung.

Vödisch M, Albrecht D, Lessing F, Schmidt A, Winkler R, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. Two dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, eingereicht.

Kniemeyer O, Lessing F, Brakhage AA (2008) Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, im Druck.

Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA (2007) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic Cell* 6: 2290-2302.

Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Current Genetics* 49: 178-189.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise in den folgenden Kongressen als Poster und in Vorträgen präsentiert:

Lessing F, O Kniemeyer, A A Brakhage (2005) Vortrag: "Defence of *Aspergillus fumigatus* against reactive oxygen species mediated by AfYap1". Tagung: "VAAM Jahrestagung" in Bochum.

Lessing F, O Kniemeyer, D Albrecht, O Scheibner, R Guthke, A A Brakhage (2006) Posterpräsentation: "Comparative proteomics of the stress response of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*". Tagung: "Stress in Yeasts and Filamentous Fungi" in Birmingham.

Lessing F, A D Schmidt, O Kniemeyer, O Scheibner, H Haas, A A Brakhage (2006) Posterpräsentation: „The response of the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* against different environmental stresses". Tagung: "VAAM Pathogenic fungi" in Jena.

Lessing F, O Kniemeyer, A A Brakhage (2007) Vortrag: "Defence of *Aspergillus fumigatus* against reactive oxygen species mediated by AfYap1 and their role during infection." Tagung: "VAAM Jahrestagung" in Osnabrück.

Lessing F, O Kniemeyer, A A Brakhage (2007) Vortrag: „Role of reactive oxygen intermediates in virulence mechanisms of *A. fumigatus*". Tagung: "Second FEBS advanced lecture course: Human Fungal Pathogens" in Nizza.

Lessing F, O Kniemeyer, A A Brakhage (2008) Vortrag: „Defence of *Aspergillus fumigatus* against reactive oxygen species mediated by AfYap1". Tagung: "9th European Conference on Fungal Genetics (ECFG9)" in Edinburgh.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Brakhage für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung eine so interessante Doktorarbeit anzufertigen. Er war stets an dem Fortgang der Arbeit interessiert und half gerne bei der Diskussion der Ergebnisse und bei der Problemfindung, wenn es mal nicht weiter ging. In diesem Zusammenhang danke ich auch Olaf Kniemeyer für die exzellente Betreuung während meiner Doktorarbeitszeit. Ich verdanke ihm nicht nur die Versorgung mit immer neuen, arbeitsrelevanten Artikeln sondern auch das Verständnis aller proteinbiochemischen Methoden.

Ich möchte mich bei Frau Kothe und Herrn Löffler für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Und Herrn Löffler und Herrn Kurzai zusätzlich für die gute Betreuung während meiner Zeit in Würzburg meinen Dank aussprechen.

Ich danke ausserdem den ehemaligen „AxB“ Labormitarbeitern aus dem Fachbereich Mikrobiologie Hannover. Namentlich Herrn Plattner, Armgard, Inge, Sybille, Marion und Michael.

Ich bedanke mich für die ständige Hilfsbereitschaft und Diskussion wissenschaftlicher Fragen aller Art bei Matthias Brock, Christian Fleck, Felicitas Schöbel und Alexander Gehrke. Für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit danke ich ganz besonders Silke Steinbach, Judith Behnsen, Vito und Christian. Auch die Diskussion mit Fachkräften aus anderen Abteilungen hat mir immer weiter geholfen. Deshalb bedanke ich mich an dieser Stelle bei Frau Möllmann, Daniela Albrecht, Iwona Wozniok, Robert Winkler und Olaf Scheibner.

Eine gute Arbeitsatmosphäre machte das Arbeiten auch an mal nicht so guten Tagen besonders durch die Mithilfe von Thorsten, Petra, André, Sebastian, Marcel, Sandra, Jeannette, Britta, Nancy, Kristine, Sylke, Daniel, Peter und Martin sehr angenehm. Ausserdem geht ein ganz großes Lob an die gesamte MAM wegen dem dort spürbaren Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft in allen „Labor-Lebenslagen“.

Ilse Jacobsen danke ich für die Durchführung der Mausinfektionen und allen damit verbundenen Erklärungen und für ihre Geduld.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich bei allen Vorhaben in meinem Leben immer unterstützt hat und mir auch bei der Doktorarbeit helfend zur Seite stand. Meinen Eltern, die immer gesagt haben: „Du schaffst das und machst das alles prima!“ und meinem Mann, der mir mit einem liebevollen Schubs aus so manchem Tal herausgeholfen hat.

Ich danke Euch allen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Franziska Leßing
Geboren: 20.12.1978
in Bad Hersfeld

Werdegang:

- 08/2004-05/2008 Promotion zum Dr. rer. nat. in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Axel A. Brakhage an der Universität Friedrich Schiller Universität Jena (Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie)
Thema: „Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Stresstoleranz von *Aspergillus fumigatus* bei der Interaktion mit Immuneffektorzellen“
- 10/2003 Abschluss des Studiums der Biologie mit Diplom
Gesamtnote: sehr gut (1,5)
- 12/2002-08/2003 Diplomarbeit an der Phillips-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regina Kahmann am Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie
Thema: „Siderophore als Virulenzfaktoren in *Ustilago maydis*“
- 10/2000 Vordiplomprüfung
Gesamtnote: gut (2,1)
- 09/1998 Beginn des Biologiestudiums auf Diplom an der Phillips-Universität Marburg
- 06/1998 Allgemeine Hochschulreife am Paul Klee Gymnasium Overath
Gesamtnote: gut (2,1)

Eigenständigkeitserklärung:

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller-Universität ist mir bekannt. Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen, persönliche Mitteilungen und Hilfsmittel benutzt.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mich die in der Danksagung meiner Dissertation genannten Personen unterstützt. Personen, die bei der Anfertigung der Publikationen beteiligt waren, sind am in der Publikationsliste angegeben.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht, diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

.....

Franziska Leßing

Tabelle 1 Anhang**H₂O₂ regulierte Proteine im *A. fumigatus* Wildtypstamm.**

H₂O₂ Regulation								
			Accession-nr.	Protein	Spot Nr.	MS/ total	pl/MW	
15	45min				Mascot	Seq.cov.		
				Antioxidative Proteine				
1	+4,3	+10,3	gi 70984685	Allergen Asp F3	2480	119,0	53,0	5,7/18,5
2	+2,1	+3,7	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1	2249	97,9	54,0	5,3/23,4
3	+2,0	-2,0	gi 70994134	Cytochrome C Perox.	1980	97,0	35,5	9,2/40,4
4	+2,7	+1,2	gi 70997966	Cu/Zn Sod	5366	122,0	75,3	5,8/16,4
5	-	+1,3	gi 70986104	Katalase Cat1	634	176,0	29,3	5,4/79,9
				Hitzeschock				
6	+1,8	+2,5	gi 70998901	30 kDa Hitzeschock	2239	74,5	51,5	6,1/20,5
				Proteasen				
7	+1,2	-2,0	gi 70994510	Zn-abh. Protease	1221	91,6	17,5	5,3/118,5
				Translation				
8	+1,0	-1,6	gi 70994928	Transl. Initiationsf.	2112	159,0	61,5	5,9/41,6
				Pentose-P-Zyklus				
9	+2,1	+2,1	gi 70995930	Transketolase TktA	813	192,0	42,5	6,1/74,8
10	+2,3	-1,0	gi 70997968	Transaldolase	4993	204,0	60,8	6,0/35,4
				Glykolyse				
11	+1,9	+2,3	gi 70985278	Glycerald.-3-P-DH	1777	87,9	40,5	7,7/36,3
12	+1,7	+3,2	gi 70991192	Pyruvat-DH α UE	1400	154,0	57,3	6,4/41,5
				Fettsäure oder Lipidmetabolismus				
13	+1,0	-2,1	gi 70998574	Zn-abh. Alkohol-DH	1747	118,0	59,4	8,7/37,2
14	+1,2	+1,6	gi 70983360	CoA Acetyltrans.	1481	105,0	46,5	6,5/40,9
				Polyaminweg				
15	+2,9	+1,3	gi 70995928	Spermidinsynthase	5053	67,8	32,8	5,2/33,4
				Aminosäuremetab.				
16	-2,0	-2,0	gi 14632388	Glutaminsynthetase	1558	74,5	22,1	5,4/39,9
17	-1,2	-2,2	gi 70998466	Carbamoyl-P-synth.	1466	101,0	46,6	6,7/49,3
18	+1,0	+1,9	gi 70995231	Adenosylhomo.	1382	222,0	43,9	5,8/48,5
				Zytoskelettaufbau				
19	-3,1	-1,3	gi 70985226	Aktin Interaktion 2	1094	86,5	46,4	5,8/63,1
20	-1,8	+1,1	gi 15625248	β -Tubulin	4688	112,0	56,1	6,044,7
21	-1,7	-1,5	gi 70987216	Topomyosin	5285	83,9	53,9	4,8/17,9

				Regulatorische Proteine				
22	+2,2	+1,2	gi 70989229	14-3-3 Fam. Protein	4978	132,0	52,9	4,6/29,1
				Kofaktorsynthese				
23	+1,1	+2,0	gi 70985178	Thiaminbios. Nmt1	1696	178,0	57,9	5,9/38,8
				Purine und Pyrimidinsynthese				
24	+1,2	+3,4	gi 70982225	P-ribosyltransferase	387	71,8	49,1	4,7/19,5
25	+1,8	+1,4	gi 70983336	Alanyl tRNA Synth.	282	75,5	19,4	6,0/113,6
				Andere Proteine				
26	+2,3	+6,2	gi 70985948	GMC Oxidoreduktase	2108	162,0	39,6	7,4/72,1
27	-1,1	-2,1	gi 70982732	NAD abh. DH	1144	137,0	42,4	9,7/49,6
28	-2,1	-2,3	gi 70982442	UGP1	1133	146,0	43,2	6,4/56,6

+/- bezeichnet die Veränderung des relativen Spotvolumens nach 15 bzw. 45 Minuten H₂O₂ Stress im Vergleich zu T0.

Tabelle 2 Anhang

Proteomanalyse des Wildtyps im Vergleich zum Δ Afyap1 Stamm nach 45 Minuten 2mM H_2O_2 Stressinduktion.

Spot Nummer	Regulation	Accession-Nr.	Protein	MS Mascot	Total seq.cov	pI/MW
			Antioxidative Prot.			
2331	-2,01	gi 70984685	Allergen AspF3	105,0	53,0	5,2/18,5
1942	-2,81			119,0	53,0	5,2/18,5
2098	+1,51			107,0	63,7	5,2/18,5
2177	+1,47			89,2	39,9	5,2/18,5
1712	+1,99	gi 70983971	Mitoch. Perox. Prx1	97,0	40,1	9,8/29,6
1877	+2,33	gi 70994244	Mitoch. Perox. Prx1	116,0	62,0	5,3/23,4
1901	-2,31	gi 70994244	Mitoch. Perox. Prx1	112,0	51,2	5,3/23,4
1457	-1,43	gi 70994134	Cytochrom C perox.	142,0	35,8	9,2/40,4
309	+1,3	gi 70986104	Katalase cat1	155,0	24,2	5,4/79,9
394	-2,01	gi 70986104	Katalase cat1	116,0	17,9	5,4/79,9
560	-2,02	gi 70983023	Katalase Cat2	191,0	32,9	6,1/83,7
1337	+2,27	gi 70981999	Flavohämaprotein	60,18	3,6	5,7/45,6
			Hitzeschockprot.			
638	-1,75	gi 70983346	HSP-70 HscA	257,0	55,2	5,2/66,9
115	-1,68	gi 70995752	Hsp70 - Hsp88	129,0	21,7	4,9/80,0
2013	-1,29	gi 70998901	30kDa Hitzeschock	72,6	41,7	6,1/20,5
1999	-1,67					
1645	-2,17	gi 70991381	Hitzeschock, Klasse I	69,8	31,1	5,0/21,6
1731	+1,88			77,4	64,8	5,0/21,6
1793	-2,01			68,1	21,8	5,0/21,6
			Transkription/Translation			
202	-2,22	gi 70986914	Elongationsf. EF-3	159,0	36,9	5,8/117,7
1952	-4,79	gi 70996650	Elongationsfaktor-1 γ	61,9	39,1	6,0/24,4
2095	-2,91	gi 70990614	Eukaryotischer Initiationsfaktor 5A	60,1	32,3	5,5/21,2
1586	-2,02	gi 70993368	Histondemethylase	44,1	12,1	6,7/119,0
			Glykolyse/Pyruvatmetabolismus			
1257	+1,27	gi 70985278	Glycerald. 3-P DH	111,0	46,4	7,7/36,3
659	+1,6	gi 70999438	PgmA	164,0	35,5	6,3/60,5
845	+1,47			161,0	35,7	6,3/60,5
868	-1,67			152,0	38,2	6,3/60,5
967	+2,36	gi 70991192	Pyruvat DH α UE	32,9	4,9	6,4/41,5
965	-1,71			95,7	40,8	6,4/41,5
1168	+2,25			79,2	32,2	6,4/41,5
			Pentose-P-zyklus			
515	-2,04	gi 70995930	Transketolase TktA	192,0	42,5	6,1/74,8
595	+1,47	gi 70995930	Transketolase TktA	192,0	42,5	6,1/74,8

			NADPH synthese			
1704	+3,68	gi 70990724	Alkoholdehydr.	169,0	51,1	6,2/37,8
1239	+1,65	gi 71001436	Mannitol-1-P DH	143,0	36,6	5,6/43,0
			Proteasen			
1274	-1,57	gi 70999520	Endopeptidase Pep2	96,8	33,4	4,7/43,3
2586	-2,46	gi 146322420	Ubiquitin UbiA	101,0	46,7	4,5/45,0
			Purin/Pyrimidinsynthese			
886	-1,51	gi 70985853	GMP Synthase	188,0	62,1	5,8/61,4
			Aminosäuresynth.			
499	-2,39	gi 70994626	Methioninsynthase	162,0	31,4	6,3/86,8
429	-2,16			186,0	40,6	6,3/86,8
1076	-1,82	gi 71001796	Aminotransferase	111,0	21,4	9,6/52,6
1135	+1,58	gi 146323885	Glutaminsynthetase	74,5	22,1	5,4/39,9
1126	-1,36			48,8	4,2	5,4/39,9
			Nicht klassifizierte Proteine			
2134	-2,01	gi 70996869	Hypoth. Protein	111,0	74,4	4,7/25,4
734	+1,71	gi 70982442	UGP1	146,0	43,2	6,4/56,9
738	-2,11			164,0	55,4	6,4/56,9
736	-2,03			158,0	63,0	6,4/56,9
906	+1,57			120,0	46,8	6,4/56,9
983	-1,84			96,7	38,7	6,4/56,9
1688	-1,54	gi 70985777	Hypoth. Protein	99,6	34,7	5,0/27,9
1979	-2,25	gi 70997834	P-Nitroreduktase	72,0	40,1	5,6/24,3
194	-1,79	gi 70993478	PH Domänen Protein	108,0	22,0	4,9/57,0
2415	-1,85	gi 71000343	cis trans Isomerase	94,5	52,8	9,0/17,7
2504	-1,46	gi 70995183	Hypoth. Protein	57,9	70,4	5,9/9,2
1023	+2,27	gi 70991609	GDP-Mannose-P	47,0	2,9	5,9/58,4
2218	+1,66	gi 70997699	Cofilin	104,0	11,0	5,4/17,0
826	+1,55	gi 71000525	Sirohäm synthase	121,0	60,5	6,1/61,4
970	-3,03	gi 70986973	Septin AspB	78,0	19,9	5,9/59,3

+/- zeigt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität beim Vergleich Wildtyp (2mM H₂O₂) gegen $\Delta Afyap1$ Stamm (2mM H₂O₂) an.

Tabelle 3 Anhang**Sektretom von *A. fumigatus* nach Diamidinduktion.**

Spot	wt +/-	Δ vs wt	Accession	Protein	MS/ Mascot score	Total Seq. Cov.	pI/ MW
Antioxidative Prot.							
12	+1,27	+1,16	gi 2431866	Katalase Cat1	161,0	38,3	5,4/79,9
13	+1,85	+1,06	gi 2431866	Katalase Cat1	98,3	23,4	5,4/79,9
14	+1,85	+1,14	gi 2431866	Katalase Cat1	150,0	39,1	5,4/79,9
7	+1,32	+2,06	gi 2431866	Katalase cat1	161,0	35,3	5,4/79,9
10	+2,27	-1,59	gi 70983023	Katalase cat2	191,0	32,9	6,1/83,7
71	+1,01	-1,11	gi 70993650	Mn SOD (SodB)	76,9	47,9	9,4/25,1
72	+1,12	-1,07	gi 70993650	Mn SOD (SodB)	98,8	84,3	9,4/25,1
82	+1,47	+15,8	gi 70993650	Mn SOD (sodB)	95,8	40,2	9,4/25,1
84	+1,82	+1,33	gi 17426133	Cu/Zn SOD	115,6	49,7	5,8/15,9
85	+1,10	+1,25	gi 17426133	Cu/Zn SOD	67,1	49,7	5,8/15,9
77	+1,60	+2,2	gi 70995928	Spermidinsynthase	111,0	32,8	5,2/33,4
Proteasen							
2	+1,53		gi 70994076	Endopeptidase AP3	61,97	2,8	5,5/67,8
31	+1,44	-1,27	gi 71000273	Proteasom Rpt1	276,0	50,6	8,6/48,9
4	+1,14		gi 2340046	Peptidyl-Peptidase	49,7	11,0	5,5/79,6
5	+1,01	+1,18	gi 2340046	Peptidyl-Peptidase	79,0	21,1	5,5/79,6
6	+1,21	+1,13	gi 2340046	Peptidyl-Peptidase	138,0	33,7	5,5/79,6
48	+1,28	+1,46	gi 70993508	Serine Protease Alp1	58,4	25,6	6,3/42,2
49	+1,08	+1,50	gi 384177	alkaline Protease	76,11	7,2	6,6/42,1
50	+1,06	+1,50	gi 384177	alkaline Protease	61,37	3,0	6,6/42,1
15	-1,03		gi 70985761	Aminopeptidase Y	51,31	2,3	5,4/86,4
33	+1,74	+1,26	gi 70999544	V Chitinase	72,6	30,4	5,1/43,6
56	+1,1	+1,10	gi 70985687	Zellwandglucanase	72,9	26,9	4,8/44,6
30	+1,03	+1,57	gi 70996472	α Glucosidase B	118,0	24,9	6,0/98,8
23	+1,06	+1,09	gi 70996140	α -Mannosidase	109,3	46,5	5,0/53,8
24	+1,06	+1,39	gi 70996140	α -Mannosidase	71,62	52,9	5,0/53,8
32	+1,46	+1,84	gi 70993214	β -N-Acetylhexoaminid.	63,4	28,0	5,0/36,7
89	+4,85	-1,19	gi 1220098	Hämolsin	72,9	67,2	5,1/14,3
90	+4,04	+3,17	gi 70997691	Ubi-cyto. C Reduktase	59,8	25,8	10/32,6
91	+2,49	-1,89	gi 1220098	Hämolsin	47,9	67,2	5,1/14,3
92	+2,49		gi 1220098	Hämolsin	47,9	67,2	5,1/14,3
Aminosäuresynthese							
3	-1,27		gi 71000415	Glutaminase A	79,0	33,1	4,6/76,1
Glykolyse/NADPH							
21	+1,43	-1,07	gi 70999438	Phosphoglukomutase	66,8	24,3	6,3/60,5
34	+1,08	-1,09	gi 71001436	Mannitol-1-P-DH	122,0	37,6	5,6/43,0
35	+1,76	-1,12	gi 70984134	Format DH	50,60	12,0	9,2/45,7
45	+2,19	+2,93	gi 70986899	Malat DH	148,0	48,8	9,5/35,9
25	+1,14	+1,36	gi 70991443	Enolase	118,0	51,6	5,3/47,3
41	-9,58	+9,87	gi 709979	Transaldolase	122,0	34,6	6,0/35,4
28	+4,58	+1,66	gi 70988990	Dihydrolipoamid-DH	132,0	48,1	9,1/54,9
64	+1,49	-1,43	gi 70997109	Triose P Isomerase	127,0	58,6	5,8/28,1

65	-4,20	+13,21	gi 70997109	Triose P Isomerase	79,5	25,4	5,8/28,1
Unklassifizierte							
11	+1,24	+2,47	gi 70994626	S-Methyltransferase	133,0	27,5	6,3/86,8
42	-1,19	-1,11	gi 70993334	Guanin- binde Prot.	176,0	65,2	6,1/35,0
61	-1,13	+1,69	gi 70993334	Guanin- binde Prot.	50,2	29,7	6,1/35,0
62	+1,64	+1,154	gi 70993334	Guanin- binde Prot.	87,6	29,7	6,1/35,0
19	+1,11	-1,07	gi 70985948	GMC Oxidoreduktase	162,0	39,6	7,4/72,1
26	+1,14		gi 70985799	FAD abh. Oxygenase	71,6	19,5	6,6/55,0
27	+1,24	+1,88	gi 70985799	FAD abh. Oxygenase	95,6	33,5	6,6/55,0
40	-1,11	-1,98	gi 70994238	Regucalcin	65,9	31,3	5,4/31,3
44	+1,08	+8,93	gi 71000943	Prot. Afu2g08170	68,2	37,3	6,8/46,4
52	+1,15	-1,59	gi 70990626	Prot. Afu1g04130	135,0	52,3	7,2/46,4
53	+1,63	-1,0	gi 70990626	Afu1g04130	75,8	3,6	7,2/46,4
57	-1,27	-1,19	gi 70990626	Afu1g04130	109,0	48,0	7,2/46,4
58	+1,42	+1,44	gi 70990626	Afu1g04130	74,8	40,1	7,2/46,4
59	-1,00	-1,27	gi 70990626	Afu1g04130	78,37	3,6	7,2/46,4
60	+1,39	-1,03	gi 70990626	Afu1g04130	55,18	3,6	7,2/46,4
63	+1,51		gi 70992943	Dehalogenase	105,0	46,8	6,2/26,7
87	-1,07	-2,75	gi 71001828	Allergen AspF13	77,67	11,2	4,5/15,9
66	+1,38	+1,19	gi 2879890	rAspF9	73,6	45,4	4,5/32,3
67	+1,38	+1,19	gi 2879890	rAspF9	55,2	34,1	4,5/32,3
69	+1,74	+38,8	gi 70994880	Initiationfaktor Gcn20	83,9	26,1	6,1/83,3
75	+1,37	-1,4	gi 70985388	Hypoth. Protein	56,18	7,8	4,8/22,0
76	-1,69	+1,0	gi 70988980	cis trans Isomerase	60,7	27,6	9,0/17,7
80	+2,59	+2,2	gi 70986268	Zellwandprotein PhiA	35,23	10,8	5,1/19,4
83	-1,23	+2,15	gi 70985857	Afu3g01130	66,3	49,7	5,0/18,1
86	+1,16	-1,16	gi 71000343	cis trans Isomerase	56,85	42,9	9,0/17,7
88	+2,68	+11,77	gi 70983267	Afu8g00430	94,5	52,8	5,0/18,1
93	+1,74	+1,52	gi 7100343	cis trans Isomerase	56,85	42,9	9,0/17,7
94	+1,27	+1,36	gi 7100343	cis trans Isomerase	94,5	52,8	9,0/17,7
97	+3,14	+10,7	gi 85103549	Pyrophos. Synthetase	61,9	29,4	4,9/40,3

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität an.

Tabelle 4 Anhang

Proteomveränderung nach 60 Minuten 2,5mM DETA NO Stress im *A. fumigatus* Wildtypstamm.

	Regulation	Accession	Protein			
			Antioxidative Proteine	Mascot	Seq.cov	pl/MW
580	+1,53	gi 2431866	Katalase	230,0	35,9	5,4/79,9
590	+1,97	gi 2431866	Katalase	115,0	27,5	5,4/79,9
614	+1,55	gi 70983023	bifunktionale Katalase Cat2	196,0	28,9	6,1/83,7
829	+1,73	gi 70986104	Myzeliale Katalase Cat1	188,0	24,7	5,4/79,9
885	+1,56	gi 70983023	bifunktionale Katalase Cat2	141,0	31,5	6,1/83,7
2121	+1,68	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1	116,0	62,0	5,3/23,4
2112	+1,58	gi 70994244	Mitoch. Peroxiredoxin Prx1	112,0	51,2	5,3/23,4
1951	+1,52	gi 70993650	Mn Superoxiddismutase SodB	98,8	84,3	9,4/25,1
2337	+3,92	gi 70996138	Mn Superoxiddismutase MnSOD	161,15	11,4	7,8/23,4
2308	+2,07	gi 71001902	Cytochrom C Oxidase Polypeptide Vib	66,6	60,4	7,7/10,9
2405	-1,58	gi 146322777	Cytochrom C UE Vb	78,1	57,1	6,2/21,5
2028	+1,69	gi 70995928	Spermidinsynthase	67,8	32,8	5,2/33,4
1275	-2,01	gi 50788082	Flavohämoglobin	152,0	61,5	5,7/45,4
1414	+1,58	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)	126,0	53,2	5,9/38,3
1602	+1,59	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)	178,0	57,9	5,9/38,3
1687	-2,47	gi 70985178	Thiaminbiosyntheseprotein (Nmt1)	107,0	43,0	5,9/38,3
228	+1,54	gi 70984840	Allergen Mod-E/Hsp90/Hsp1	149,0	28,3	4,8/80,6
674	+2,76	gi 70984840	Allergen Mod-E/Hsp90/Hsp1	53,4	17,0	4,8/80,6
750	-1,45	gi 71001294	Mitoch. Hsp70 Chaperon (Ssc70)	240,0	53,6	6,0/74,4
2019	+1,59	gi 71001910	Mitoch. Ko-Chaperon GrpE	97,0	36,4	8,9/28,4
867	+1,49	gi 70982394	AIF-like mitoch. Oxidoreduktase (Nfrl)	105,0	36,2	8,6/59,8
			Glykolyse/Pyruvatm./NADPH			
1647	+1,67	gi 70998574	Alkoholdehydrogenase	118,0	59,4	8,7/37,2
1694	-1,44	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase	127,0	45,6	7,8/37,5
2402	+2,4	gi 71001496	Alkoholdehydrogenase	56,9	19,1	6,4/37,6
1698	+1,95	gi 70990724	Alkoholdehydrogenase	122,0	58,0	6,2/37,8
1856	+1,84	gi 70990724	Alkoholdehydrogenase	169,0	51,1	6,2/37,8
2077	+3,01	gi 70994214	„kurze“ Dehydrogenase	70,8	22,0	5,1/30,9
2096	+1,56	gi 70983638	Mitoch. ATPase UE ATP4	90,2	22,3	9,8/29,7
2413	+4,34	gi 71001516	Acyl CoA Bindeprotein	80,0	42,4	5,7/17,3
888	-1,44	gi 70999590	Pyruvatdecarboxylase PdcA	154,0	45,5	6,1/63,0
889	+1,43	gi 70999590	Pyruvatdecarboxylase PdcA	213,0	59,9	6,1/63,0
415	+1,47	gi 70991821	β Glucosidase	61,1	11,3	5,6/95,9
1070	+1,46	gi 70994240	Aldehyd-dehydrogenase	165,0	46,5	6,5/60,0
1296	+1,59	gi 70994240	Aldehyd-dehydrogenase	179,0	43,1	6,5/60,0
1322	+1,61	gi 70992355	Aldehyd-Dehydrogenase AldA	114,0	28,4	6,3/60,9
1331	+1,41	gi 70992355	Aldehyd-Dehydrogenase AldA	147,0	36,7	6,3/60,9
755	+1,49	gi 70985198	ATP Synthase kat. UE A	164,0	41,1	5,8/74,9
678	+1,55	gi 70997109	Triosephosphatisomerase	89,4	41,0	5,8/28,1
			Translationsmaschinerie			
2674	+1,77	gi 71000597	Translationsinitiationfaktor SUI1	127,0	36,8	6,5/35,2
			Eukar. Translationselongationsfaktor	93,9	44,5	4,3/25,2
1554	-2,03	gi 146322600	1, Eef1β UE			
			Translationsinitiationselongationsfaktor	98,4	14,9	6,5/93,1
895	+1,48	gi 71002010	EF-2 UE			
			Translationselongationsfaktor eEF-1	139,0	39,2	7,8/54,1
1139	+1,5	gi 70984206	UE γ			

508	+1,68	gi 70990924	Phenylalanyl-tRNA Synthetase, β UE	67,7	8,5	5,4/67,8
Proteasen/Proteinabbau						
440	+2,96	gi 2340046	sekretierte Dipeptidylpeptidase	61,6	11,0	5,5/79,6
2310	+2,26	gi 70984657	Ubiquitin konjugiertes Enzym (UbcM)	93,6	38,3	6,1/17
2255	+1,52	gi 70991377	Proteasom- Protein Pre4	41,5	20,0	6,9/28,8
2696	+1,44	gi 70991228	Ubiquitin C-terminal Hydrolase	32,9	7,9	9,3/95,4
1663	+1,53	gi 70999520	Aspart. Endopeptidase Pep2	96,8	33,4	4,7/43,3
1986	+1,67	gi 70984070	Malat Dehydrogenase	88,6	43,6	7,6/34,8
2365	+1,39	gi 70997972	Autophagie-Serinprotease Alp2	16,4	19,1	9,4/22,2
Signaltransduktions						
1182	+1,57	gi 70993224	MAP kinase MpkA	72,4	27,8	5,5/48,4
1145	+1,44	gi 71000535	Phosphoserinephosphatase	103,0	47,8	5,5/51,8
Fettsäuremetabolismus						
910	+1,47	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4	168,0	31,4	7,1/76,7
642	+1,65	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4	168,0	37,2	7,1/76,7
646	+1,45	gi 71001286	Fettsäureaktivator Faa4	116,0	23,2	7,1/76,7
Zytoskelett						
1049	+1,57	gi 70990312	Tubulin α -1 UE	94,9	47,8	4,8/50
2407	+1,51	gi 71001050	„trafficking protein particle complex“ UE 2/Sedlin	61,2	41,7	9,3/20,4
Apoptose						
1217	+1,56	gi 103060424	Metacaspase CasA	110,0	43,3	7,1/45,2
1455	+1,57	gi 146322507	Metacaspase CasA	146,0	38,5	9,3/55,1
Unklassifizierte Proteine						
2267	+1,71	gi 70984753	Dienelactonhydrolase	93,8	19,9	9,6/35
2716	+1,96	gi 70995410	Mago Nashi Protein	60,0	28,6	6,5/17,9
1061	-2,65	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1	144,0	55,2	6,4/56,9
850	+1,95	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1	151,0	56,2	6,4/56,9
1086	+1,45	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1	97,1	26,6	6,4/56,9
1101	+1,37	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1	97,9	38,7	6,4/56,9
1297	+1,44	gi 70982442	UTP-Glc-1-P Uridyltransferase Ugp1	165	52,1	6,4/56,9
1919	+1,38	gi 70985522	GNAT fam. Acetyltransferase	98,8	64,1	5,1/29
1929	+1,57	gi 70985300	ARP2/3 Komplex UE Arc18	97,2	40,2	6,4/21,1
1962	+1,74	gi 70985777	Kon. hypoth. Protein	97,1	41,5	5,0/27,9
1463	+3,06	gi 146322542	UPF0160 Protein MYG1	97,6	37,4	5,8/40
2209	+1,62	gi 70981925	Profilin Pfy1	121,0	14,7	5,9/14,5
1975	+1,51	gi 70998160	HAD Hydrolase	72,0	31,6	4,8/27,3
			“high expression lethality protein	50,3	38,6	6,4/21,8
2149	+1,56	gi 70991116	Hel10”			
2569	+2,01	gi 71000106	Kon. hypoth. Protein	54,1	40,9	9,8/14,9
2604	+3,16	gi 70996827	Hypoth. Protein AFUA_5G14890	50,1	29,5	10,2/14,6
2667	+2,42	gi 146322779	Kon. hypoth. Protein	28,9	20,9	4,6/19,8
2379	+1,48	gi 146324125	Woronin body Protein HexA	71,8	20,5	9,3/61,4
1295	+1,45	gi 146324125	Woronin body Protein HexA	125,0	39,5	9,3/61,4
924	+1,99	gi 70991353	Glucosamin-Frc-6-P Aminotransferase	199,0	36,5	6,2/77,2
658	+1,51	gi 70991353	Glucosamin-Frc-6-P Aminotransferase	133,0	42,9	6,2/77,2
690	+2,50	gi 70987222	Aminoxidase	167,0	29,6	6,7/80
1940	+2,17	gi 70990336	ARP2/3 complex 34 kDa UE	86,9	22,2	6,4/36,9

2222	+2,62	gi 70981668	“CorA family metal ion transporter”	45,6	18,0	6,1/45,1
2233	+1,41	gi 70985777	Kon. hypoth. Protein	97,3	47,6	5,0/27,9
2334	+2,41	gi 70991807	Mitoch. Protein	161,0	64,0	9,5/27,3
2380	+3,06	gi 70990684	Kon. hypoth. Protein	39,9	13,2	10,2/45,8
2624	+1,57	gi 146322763	Kon. hypoth. Protein	42,7	19,6	6,9/39,5
2525	+3,02	gi 70992495	FKBP-type Peptidyl-Prolyl Isomerase	69,8	45,5	7,5/12,1
1586	+1,53	gi 70994660	Ornithine Carbamoyltransferase	97,1	30,5	8,9/40,1

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität beim Vergleich Wildtyp T0 gegen T60 (2,5mM DETA NO) an. Spotveränderungen von über zweifacher Standardabweichung wurden als signifikant betrachtet.

Tabelle 5 Anhang

In 2D-Gelen identifizierte *A. fumigatus* Proteine und ihre Regulation nach der Konfrontation mit PMNs.

1

Spot	Regulation	Accession Nr.	Protein	Mascot	Seq.cov.	pI/MW
			mitochondriale	45,5	6,6	6,3/85,5
392	+1,59	gi 70992645	Aconitathydratase			
590	+2,03	gi 70984170	actin Act1	71,9	22,6	5,9/43,9
702	+2,08	gi 70997705	ATP synthase F1, β UE	276,0	71,0	5,2/55,6
728	+1,65	gi 70988960	Monooxygenase, putativ	35,4	17,2	6,1/48,6
971	-1,93	gi 70991527	NmrA-like family Protein	29,0	4,6	6,3/35,4
1350	+1,63	gi 70997968	Transaldolase	204,0	60,8	6,0/34,4
2183	+1,64	gi 70990900	40S ribosomal protein S12	60,9	34,0	5,1/15,7
2223	-2,41	gi 119472505	hypoth. Prot. <i>Neosartorya</i>	32,8	18,6	6,0/28,4
2437	-2,50	gi 145235469	Hypoth. Prot. An03g05020	53,5	21,2	11/34,2
2487	+7,53	gi 70981456	Feruloyl-esterase, putativ	42,7	18,4	5,8/57,6
2538	+1,89	gi 70997942	Calcineurin katalyt. UE	44,8	16,7	5,5/63,8

2

558	-2,64	gi 70986458	Coenzyme A Transferase	37,4	14,6	7,7/56,1
1202	+1,50	gi 70985278	GpdA	111,0	46,4	7,7/36,3
1215	-2,24	gi 113212	ACT1_ABSGL Actin-1	54,9	7,9	5,2/15,7
1220	+1,52	gi 70991497	Autophagie Protein Apg5	48,9	23,6	5,9/36,1
1409	-3,29	gi 70982512	Cap binde Protein	52,2	20,9	5,5/30,1
2046	+1,96	gi 70984685	Allergen Asp F3	62,7	39,9	5,2/18,5
2063	+1,65	gi 70984685	Allergen Asp F3	109,0	50,6	5,2/18,5
2092	3,13	gi 70993070	hypoth. Protein	34,9	14,4	6,6/49,4
2146	+1,52	gi 70990614	Eukar. Faktor eIF-5A	60,1	32,3	5,5/21,2
290	+1,52	gi 70994626	Methioninsynthase MetH/D	76,5	30,7	6,3/86,8
318	+1,59	gi 70992645	Aconitathydratase,	45,5	6,6	6,3/85,5
1157	+1,60	gi 70999466	Fructose-bis-P-aldolase	122,0	43,1	5,5/39,8
1332	+1,74	gi 70986899	Malatdehydrogenase	106,0	34,4	9,5/35,9
1701	+2,00	gi 70997109	Triosephosphatisomerase	79,5	25,4	5,8/28,1

3

738	-2,47	gi 71001164	Protein HSP60	194,0	43,4	5,4/61,9
1159	+1,88	gi 113277	Actin, gamma	75,9	4,3	5,6/41,6
1559	-1,91	gi 70986899	Malatdehydrogenase	148,0	48,8	9,5/35,9
1941	+1,67	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1	112,0	51,2	5,3/23,5
2612	+3,07	gi 70981456	Feruloyl-esterase, putativ	42,7	18,4	5,8/57,6
971	-1,75	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22	90,6	27,4	5,3/47,3
1055	-2,54	gi 70994774	Glutamate DH	108,0	21,4	5,7/49,3
1073	+2,33	gi 70995281	Phosphoglyceratkinase	55,8	18,2	6,3/44,7
			Translationselongationsfakt	105,0	26,3	7,8/54,1
1128	-2,31	gi 70984206	eEF-1 γ UE			
1155	-1,80	gi 70984828	Citratsynthase (Cit1)	51,9	11,8	9,2/52,1
1468	-1,68	gi 70997968	Transaldolase	122,0	34,6	6,0/35,4
1672	+1,96	gi 67901456	Hypoth. Protein AN7715.2	48,8	18,0	6,8/44,3
1826	+1,54	gi 146324125	Protein HexA	63,8	16,4	9,3/61,4
			Enoyl-CoA	43,3	25,6	8,9/31,1
1847	+1,53	gi 70998905	Hydratase/Isomerase			
1917	-1,93	gi 70997109	Triosephosphatisomerase	79,5	25,4	5,8/28,1

2414	-1,55	gi 71000343	cis-trans Isomerase	94,5	52,8	9,0/17,7
2546	+1,88	gi 71001516	Acyl CoA Bindeprotein	56,8	42,4	5,7/17,3

4

			CorA family Metal- ion -	56,4	24,8	6,1/45,1
465	+4,45	gi 70981668	Transporter			
665	+1,75	gi 71000749	Glutamatcarboxypeptidase	146,0	39,3	5,4/53,0
738	+3,21	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22	138,0	42,5	5,3/47,3
742	+2,52	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22	149,0	47,3	5,3/47,3
928	+1,63	gi 70995343	S-Adenosylmethionins.	177,0	59,2	5,6/42,2
1123	+3,14	gi 70993334	G-Protein Complex β CpcB	177,0	69,9	6,1/35
1211	+2,77	gi 70993334	G-Protein Complex β CpcB	73,9	27,2	6,1/35
1239	+2,41	gi 70986899	Malatdehydrogenase	106,0	34,4	9,5/35,9
			Elongationsfaktor 1 UE	149,0	63,9	4,3/25,2
1324	+2,50	gi 146322600	Eef1- β			
			Elongationsfaktor 1 UE	114,0	52,4	4,3/25,2
1382	+2,68	gi 146322600	Eef1- β			
1548	+1,93	gi 70995380	Adenylylsulfatkinase	100,0	53,6	6,6/23,6
1638	+1,70	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1	125,0	56,3	5,3/23,4
1643	+2,59	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1	111,0	54,0	5,3/23,4
1679	+1,57	gi 70988905	Konserv. Hypoth. Protein	37,0	10,3	6,1/50,3
1715	+2,04	gi 70983638	mitochondriale ATPase	65,2	22,3	9,8/29,7
1729	+1,97	gi 70994950	Guanylatkinase	83,9	41,2	7,7/25,5
1766	+1,54	gi 70984364	ATP Synthase D Kette,	88,3	31,8	9,7/28,7
1793	+2,87	gi 70995808	60S ribosomales Protein	46,8	4,9	9,1/35,5
1812	+2,27	gi 70984685	Allergen Asp F3	77,4	46,6	5,2/18,5
			Translationsinitiationsfaktor	54,3	32,2	5,5/21,2
1843	+1,76	gi 70990614	eIF-5A			
			CorA family Metal- ion -	42,3	18,0	6,1/45,1
1857	+2,25	gi 70981668	Transporter			
			CorA family Metal- ion -	56,4	24,8	6,1/45,1
1888	+2,52	gi 70981668	Transporter, putativ			
			Polypeptid-assoz. Complex	42,6	10,2	5,2/20,5
1899	+1,73	gi 70984591	(NAC)			

5

			Formyltransferase/IMP	87,7	27,2	6,4/65,0
412	-1,94	gi 70994557	Cyclohydrolase			
620	-1,92	gi 146323557	Sensor Histidin Kinase	43,3	9,1	6,7/138
			Rekombin. hotspot-binde	32,8	21,3	5,6/26,4
713	+1,53	gi 146323452	Protein (Translin)			
			Formatdehydrogenase	50,6	12,0	9,2/45,7
994	+2,00	gi 70984134	AciA/Fdh			
1043	+1,71	gi 70983454	MFS Transporter, putativ	42,8	19,4	9,4/50,7
1077	-1,91	gi 70992617	Oxidoreductase 39 kDa UE	202,0	52,6	9,1/43,7
1213	+2,15	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase	127,0	45,6	7,8/37,5
1250	-1,99	gi 70992231	HAD superfamily Hydrolase	60,9	30,5	5,1/30,6
			RNA Polymerase II	37,6	10,2	6,3/67,8
1566	-1,96	gi 70988949	Elongationsfaktor Rtf1p			
			Hitzeschockprotein	44,1	16,1	6,1/20,5
1659	+1,55	gi 70998901	Hsp30/Hsp42			
			Mn Superoxiddismutase	55,6	27,6	7,8/23,4
1756	-1,56	gi 70996138	MnSOD			
			Nascent Polypeptid-assoz.	43,8	30,6	5,2/20,5
1914	+2,31	gi 70984591	Complex (NAC)			

6

489	+2,08	gi 146323966	integrales Membranprotein	39,3	27,4	7,8/18,7
			Hypoth. Protein	38,3	22,8	5,7/20,3
612	+2,11	gi 70983678	AFUA_8G05650			
694	+1,93	gi 146324886	AAA family ATPase, putativ	45,0	13,5	5,2/71,7
705	+2,29	gi 70985436	RAN GTPase (Ran)	44,4	16,0	9,0/53,7
720	+2,26	gi 70991575	Pyruvatkinase	116,0	31,1	6,7/58,3
			Actin Zytoskeletprotein	28,4	9,8	5,9/28,2
740	+2,84	gi 71001310	(VIP1)			
764	+3,76	gi 44890043	Hypoth. Protein	33,4	16,0	4,9/29,8
810	+1,53	gi 70984557	Acetylglutamatkinase	93,3	18,1	8,9/99,4
825	+2,05	gi 70983378	Cholinoxidase (CodA)	33,2	11,8	6,4/60,1
893	+1,58	gi 146322501	Faktor EF-1 α UE	101,0	31,0	9,9/53,6
1015	+2,29	gi 70997323	Konserv. hypoth. Protein	30,8	17,1	9,9/28,6
1105	+2,00	gi 70991893	Bisphosphatnucleotidase	39,7	18,1	5,5/44,1
1162	+2,95	gi 70999137	40S ribosomales Protein	106,0	45,6	4,7/32,1
1163	+1,99	gi 70998757	Konserv. hypoth. Protein	33,5	18,4	5,2/25,8
1170	-2,02	gi 70991585	WD repeat Protein	33,9	7,9	5,7/126
1247	+1,68	gi 70991156	CBS and PB1 Protein	38,7	11,6	6,0/71,8
1273	+1,66	gi 70992133	Aldehydreduktase (AKR1)	154,0	54,8	6,0/37,2
1388	+2,06	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase	90,2	41,9	7,8/37,5
1444	+1,71	gi 70983346	Hsp70 Chaperon (HscA)	51,8	13,2	5,2/66,9
1793	+1,78	gi 70982225	Xpt1	71,8	49,1	4,7/19,5
1896	+1,65	gi 70994244	Peroxiredoxin Prx1	105,0	54,0	5,3/23,4
			CorA family Metal- ion -	40,8	18,0	6,1/45,1
1941	+1,88	gi 70981668	Transporter			
			mitochondriale ATPase UE	53,7	19,7	9,8/29,7
1972	+1,62	gi 70983638	ATP4			
1986	+1,85	gi 70988905	Konserv. hypoth. Protein	37,7	13,5	6,1/50,3
1990	+1,65	gi 70999137	40S ribosomales Protein	89,1	41,1	4,7/32,1

7

			Acetylglucosaminpyrophos	156,0	33,2	5,7/56,7
			phorylase			
703	+4,23	gi 70982372	CorA family Metal- ion -	41,4	18,0	6,1/45,1
			Transporter			
974	+1,51	gi 70981668	Ubiquinonoxidorreduktase	225,0	46,3	9,1/43,7
1404	+1,51	gi 70992617	Lactoyl-Glutathionlyase	66,1	25,2	5,9/36,5
1445	+2,65	gi 70991673	Alkoholdehydrogenase	90,8	34,0	7,8/37,5
1546	+1,89	gi 70982604	Mst3-like Proteinkinase	33,8	14,1	6,2/57,8
2356	-2,87	gi 70985228	Proteinkinase (NpkA)	27,5	9,6	9,6/53,7
2410	-2,96	gi 71001246	CBS and PB1 domain	35,8	13,0	6,0/71,8
2742	-2,66	gi 70991156				

8

394	-3,78	gi 70991066	Konserv. hypoth. Protein	52,3	6,3	4,6/227
429	+2,08	gi 146323362	Kationentransporter ChaC	42,9	24,9	5,1/34,1
			Hypoth. Protein	31,2	36,7	5,6/8,4
464	-11,3	gi 70994782	AFUA_4G06580			
473	+1,75	gi 70989201	Kinesin family Protein	36,1	10,6	10,4/111
			Translationselongationsfact	34,8	15,0	6,6/48,3
484	+2,31	gi 70995660	or EF-Tu			
			Translationselongationsfact	125,0	35,3	7,8/54,1
1031	+1,77	gi 70984206	or eEF-1 γ UE			
1062	+1,52	gi 70986458	Coenzyme A transferase	37,4	14,6	9,3/56,1

			G-protein Komplex β UE	69,0	27,2	6,1/35,0
1314	+2,05	gi 70993334	CpcB			
1360	+2,68	gi 70982604	Alkoholdehydrogenase	127,0	45,6	7,8/37,5
1722	-3,58	gi 71002010	Faktor EF-2 UE	34,2	5,7	6,5/93,1
1734	-3,81	gi 70991156	CBS and PB1 Protein	36,3	13,0	6,0/71,8
2166	-4,04	gi 70990380	dUTPase (Dut)	35,9	18,8	9,5/26,5
9						
484				63,2	17,5	6,1/74,8
b	+3,67	gi 70995930	Transketolase TktA			
700	+1,55	gi 70991443	Enolase/Allergen Asp F 22	138,0	42,5	5,3/47,3
			APSES	50,0	18,0	7,7/47,0
713	-3,56	gi 70997529	Transkriptionsfaktor			
719	+1,83	gi 71002144	Proteinkinase	42,8	11,3	9,1/73,2
			Hypoth. Protein	35,1	34,8	5,0/12,2
1655	-2,35	gi 71001838	AFUA_2G12690			
1885	-2,35	gi 70991893	Bisphosphatnukleotidase	37,2	16,1	5,5/44,1
			nascent Polypeptid-assoz	50,2	30,6	5,2/20,5
1925	-2,11	gi 70984591	Komplex (NAC)			
			GNAT family N-	27,3	16,5	6,4/28,5
1940	+1,52	gi 70985578	acetyltransferase, putativ			
1948	-2,31	Gi 17426133	Cu/Zn Superoxiddismutase	43,3	34,6	5,8/15,9

+/- gibt die Veränderung der relativen Spotvolumenintensität an.

Biologische Replikate sind mit grünen Nummern in der Tabelle gekennzeichnet.

Erzeugung des Deletionskonstrukts $\Delta gsn0/Af$.

Zur Deletion des Nitrosoglutathionreduktasegens *gsn0* in *A. fumigatus* wurden dessen flankierenden Bereiche mit Hilfe der Primer 25/26 und 27/28 in einer PCR mit genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Das PCR Produkt der linken Flanke umfasste einen Bereich von 1013 Basenpaaren und trug eine *SfiI* und eine *XmaI* Schnittstelle zur späteren Klonierung. Die rechte Flanke wurde als 820bp grosses PCR Produkt amplifiziert, die Überhänge für den Verdau mit *SfiI* und *XhoI* trug. Beide Flanken wurden direkt *SfiI/XmaI* bzw. *SfiI/XhoI* verdaut und mit dem *SfiI/XmaI/XhoI* verdauten Vektor pSK275 ligiert. pSK275 ist ein pUC 18 Derivat, das die Pyrimethaminresistenzkassette zur Selektion in *A. fumigatus* trägt (S. Krappmann; persönl. Mitteilung). Da *SfiI* Überhänge variable Basenpaare enthalten, war nur eine gerichtete Ligation der Fragmente möglich. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* transformiert und das Plasmid zur Deletion von *gsn0* in *A. fumigatus* pSK275 $\Delta gsn0$ -PtrA reisoliert. Zur *gsn0* Deletion im $\Delta fhp1$ Deletionsstamm wurde das $\Delta gsn0$ Konstrukt auf Hygromycinresistenz umklont, da der $\Delta fhp1$ Stamm bereits pyrimethaminresistent war. Zur Amplifizierung der Hygromycinresistenzkassette wurden die Primer Af13 und Af15 (Zur Verfügung gestellt von J. Schmalzer) mit dem Vektor pUCHph als Matrize in einer PCR eingesetzt. Das erhaltene PCR Produkt war 3,1 kb gross und umfasste den *gpdA* Promotor, das *hph* Gen zur Hygromycinresistenz und den NOS Terminator. Das Fragment wurde nach Verdau mit *SfiI* direkt in den pSK275 $\Delta gsn0/SfiI$ Vektor ligiert. Der entstandene Vektor pSK275 $\Delta gsn0$ -hph ist in Abbildung IA dargestellt und diente der Isolation des Deletionskonstrukts durch einen *BssHII* Restriktionsverdau.

Deletion von *gsn0* im *A. fumigatus* Wildtyp und ATCC $\Delta fhp1$ Stamm.

Nachdem die Deletion der Nitrosoglutathionreduktase in *C. neoformans* die Virulenz des $\Delta fhb1$ Stammes weiter reduzierte, wurde nicht nur der *A. fumigatus* Wildtyp sondern auch der ATCC $\Delta fhp1$ Stamm (M. Vödisch) mit dem $\Delta gsn0$ Konstrukt transformiert. Im Gegensatz zu den $\Delta Afyap1$ und $\Delta Afskn7$ Deletionsstämmen zeigte der $\Delta fhp1$ Stamm erhöhte Sensitivität gegen DETA NO auf Platte (Martin Vödisch, persönliche Mitteilung).

Das Deletionskonstrukt ließ sich mit dem Restriktionsenzym *BssHII* aus dem Vektor pSK275 $\Delta gsn0$ -hph ausschneiden und zur Transformation von *A. fumigatus* einsetzen. Nach erfolgreicher Transformation des ATCC Wildtyp und des ATCC $\Delta fhp1$ Stammes konnten 6 hygromycinresistente Transformanten isoliert und im Southern Blot getestet werden. Aus ihnen wurde genomische DNA isoliert. Als Sonde diente die rechte Flanke des Deletionskonstrukts (Abbildung IB). Transformation und „Southern Blot“ wurden in Zusammenarbeit mit Sandra Wolke durchgeführt.

